

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Ecole Doctorale Gc2iD

INSERM UMR S 676 – équipe Olivier BAUD

EFFETS DU MONOXYDE D'AZOTE INHALE
SUR LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT
CHEZ LE RATON

Par Gauthier LORON

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le Professeur Olivier BAUD

Présentée et soutenue publiquement le 15 Novembre 2012

Devant un jury composé de :

Monsieur Anh-Tuan DINH-XUAN, Président

Monsieur Bruno GONZALES, Rapporteur

Monsieur Brahim NAIT-OUESMAR, Rapporteur

Monsieur Pierre GRESSENS, Examineur

Madame Nathalie BEDNAREK-WEIRAUCH, Examinatrice

RESUME

L'inhalation de monoxyde d'azote (NO) est l'une des thérapies les plus utilisées en réanimation néonatale. Cependant, peu de données sont disponibles sur l'impact de l'inhalation de NO sur le développement cérébral et le devenir des enfants prématurés. Nous avons étudié l'impact du monoxyde d'azote inhalé (iNO) sur le cerveau en développement chez le rongeur.

Des portées et leur mère sont placés sous 5 à 20 ppm de NO de la naissance (P0) jusqu'au 7^{ème} jour de vie postnatal (P7).

Les animaux exposés au NO présentent une augmentation transitoire de l'angiogenèse et de la myélinisation, sans incidence sur les fonctions cognitives à l'âge adulte. L'exposition au NO est associée à une prolifération d'oligodendrocytes immatures et à une maturation anticipée des formes myélinisantes. Les rôles du NO endogène et du couple VEGF/VEGFR2 dans ces effets ont été évalués via l'injection d'antagonistes : LNAME pour inhiber les NOS, SU-5416 comme antagoniste du VEGFR2. Dans les deux cas, l'inhalation de NO corrige les anomalies de myélinisation et d'angiogenèse induites par ces inhibiteurs.

Nous avons soumis des rats à une agression excitotoxique par injection intracérébrale d'agonistes du glutamate. A P10 les rats exposés au iNO avant l'injection présentent des lésions moins importantes ; ainsi qu'une diminution de densité des microglies activées et des astrocytes. Cet effet neuroprotecteur est associé à une régulation de sous-unités des récepteurs au glutamate dès P5. Cet effet transcriptionnel semble lié à la modulation de la signalisation pCREB/Akt.

Les effets à distance du iNO sont liés à un transport réversible endovasculaire du NO. *In fine*, du NO est délivré à la cellule et les concentrations intracellulaires de cGMP augmentent d'un facteur 5. Plusieurs facteurs de transcription sont régulés : PDGFR- α , Sema3F, les sous-unités des récepteurs au glutamate, Thrombospondine-1. Cette dernière est un antagoniste naturel de la signalisation NO-cGMP. L'injection de ABT-510, agoniste de TSP-1, abolit les effets du iNO, confirmant l'hypothèse que les effets à distance reposent sur la signalisation NO-Guanylate Cyclase soluble-cGMP.

Au total, nous avons démontré que le iNO est transporté de manière réversible et délivré au cerveau en développement. Il y exerce un effet pro-angiogénique et pro-myélinisant, via une signalisation cGMP, régulée par la thrombospondine-1. Plus encore, l'exposition prophylactique au iNO diminue l'impact d'une agression excitotoxique. Ce qui augure de propriétés neuroprotectrices prometteuses en néonatalogie, et au delà.

ABSTRACT

Inhaled nitric oxide (iNO) is one of the most promising therapies used in neonates, but little is known about its effect on the developing brain. We explored the effects of iNO on developing brain in rodent pups, and pathway involved in iNO remote effects.

Rat pups and their mothers were placed in a chamber containing 5 to 20 ppm of NO for 7 days after birth. Extensive serum analysis, immunochemistry, RT-PCR analysis, were performed

Neonatal exposure to iNO was associated with a transient increase in central nervous system myelination and angiogenesis in rats, without any behavioral consequences in adulthood. Exposure to iNO was associated with a proliferative effect on immature oligodendrocytes and a subsequent promaturational effect. The role of endogenous NO in myelination was investigated in animals treated with the nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in the neonatal period ; this led to protracted myelination defects and subsequent behavioral deficits in adulthood. These effects were reversed by rescuing L-NAME-treated animals with iNO.

We challenged animals with intracranial injection of glutamate agonists. At P10, rat pups exposed to iNO exhibited a significant decrease of lesion size in both the white matter and cortical plate compared to controls. Microglia activation and astrogliosis were found significantly decreased in NO-exposed animals. This neuroprotective effect was associated with a significant decrease of several glutamate receptor subunits expression at P5. iNO was associated with an early (P1) downregulation of pCREB/pAkt expression and induced an increase in pAkt protein concentration in response to excitotoxic challenge (P7)

Those effects were related to a release of NO to the cells, and a rise of cGMP intracellular concentration. Several transcription factor were regulated, namely PDGFR- α , Sema3F, TSP-1, glutamate receptors subunits, Thrombospondin-1. The latter was responsible for NO pathway regulation, and injection of TSP-1 agonist (AbT-510) abolished iNO remote effects. iNO remote effects are not associated VEGF concentration increase nor VEGFR stimulation, as VEGF-R antagonist SU54-16 failed to abolish iNO effects on angiogenesis and myelination. Moreover iNO reverses severe myelination and angiogenesis defects induced by this SU-5416

Thus, we demonstrate transport and considerable remote effect of iNO on angiogenesis and myelination in rodents. Those effects are related to an enhancement of cGMP pathway, regulated by TSP-1, and transcriptional effects. Moreover we described and investigated the neuroprotective effect of iNO in neonatal excitotoxic-induced brain damage. These data point to potential new avenues for neuroprotection in human perinatal brain damage.

MOTS-CLES

Monoxyde d'azote

Myélinisation

Angiogénèse

Neuroprotection

Prématuré

Cerveau

Lésion du cerveau en développement

Rat

KEYWORDS

Nitric oxide

Myelination

Angiogenesis

Neuroprotection

Preterm

Brain

Developing Brain Injury

Rat

REMERCIEMENTS

Mes remerciements sincères au Professeur Anh-Tuan Dinh-Xuan, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. J'ai eu la chance il y a quelques années de bénéficier de votre enseignement sur le monoxyde d'azote, et je serai très heureux de recevoir votre avis sur ce sujet de recherche.

Je souhaite également remercier le Dr Bruno Gonzales : je suis très honoré de bénéficier de votre expertise dans le jugement de ce travail.

Dr Naït-Oumesmar, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, et de m'apporter votre critique éclairée.

Pierre, je mesure la chance d'avoir pu travailler au sein de l'U676 durant mon master, puis jamais très loin durant ma thèse. C'est une chance pour un étudiant d'apercevoir la précision de tes connaissances, surtout quand elles sont dispensées avec tant de patience et de bienveillance.

Nathalie, merci encore de m'offrir un peu de ton temps si demandé pour lire et juger ce travail ! J'ai la chance de bénéficier de ton regard d'expert dans ce domaine de la neurologie périnatale qui nous est cher. Merci pour ton érudition, ton énergie, ta gentillesse. A ton contact, j'ai tellement appris !

Merci à Olivier, patient mentor à l'origine de tout ce travail. Ces quelques années sous ta direction ont été une période bénie. Tu as animé notre équipe avec ton énergie peu commune, ta disponibilité, ton humour, et toujours le goût de « chercher » et de « trouver ». Quelle chance d'avoir pu étudier dans cette dynamique ! Ta passion est communicative. J'ai eu comme mentor quelqu'un qui m'inspirera longtemps.

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans l'aide de mes collègues du CHU de Reims. Merci à Patrice Morville qui m'a guidé durant tout mon parcours. Merci à Brigitte, Odile, Ahmad, Mickael, Nathalie encore, Alexandra, Elodie, Laurent, Pascaline et Lorraine, Christelle, Emmanuelle : pas de recherche en médecine si d'autres ne sont pas sur le pont à couvrir le service. Je mesure la chance d'avoir eu votre soutien à tous, indéfectible. Merci à vous. Je suis impatient de bientôt rentrer « à la maison ».

Merci aux amis de l'unité Inserm derrière ce travail : aux origines il y avait Paul, Romain, Vincent, Benjamin, Angela, Sandrine, puis Véronique, Leslie, Julien, Jérémie, Hoa, Gaëlle, Sophie... c'était le bon temps !

A Noémie, à ma famille, mes amis : tous ont pardonné les heures passées avec un ordinateur ou des rats.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	10
1.1 DE LA NITROGLYCERINE A LA DYSPLASIE BRONCHOPULMONAIRE	11
1.1.1 Découverte du NO en physiologie vasculaire	11
1.1.2 METABOLISME DU NO ENDOGENE	13
1.1.2.1 Les Nitric Oxide Synthases.	13
1.1.2.2 Cibles du NO	15
1.1.2.3 La Guanylate cyclase soluble.	16
1.1.2.4 Protéines kinases cGMP-dépendantes	17
1.1.2.5 Canaux ioniques liant les nucléotides cycliques (CNG Channels)	17
1.1.2.6 Phosphodiesterases	18
1.1.2.7 Intégration de la signalisation NO-cGMP : Relaxation de la fibre musculaire lisse	18
1.1.2.8 Signalisation par le NO et régulation de la transcription	19
1.1.2.9 NO et S-nitrosylation	20
1.1.2.10 NO et stress oxydatif/nitrosatif	21
1.1.2.11 NO, hypoxie, interférences avec la signalisation HIF-1	23
1.1.2.12 NO et métabolisme mitochondrial	23
1.1.2.13 Signalisation par le NO dans le système nerveux central	24
1.1.2.14 NO comme second messager du VEGF, Thrombospondine	26
1.1.3 UTILISATION DU NO EN NEONATOLOGIE	28
1.1.3.1 NO dans l'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né à terme	28
1.1.3.2 Usages pulmonaires du NO inhalé chez le prématuré	28
1.1.3.2.1 Physiopathologie de la dysplasie bronchopulmonaire - signal VEGF/NO.	29
1.1.3.2.2 NO en prophylaxie de la dysplasie bronchopulmonaire	30
1.2 POSSIBILITE D'UN EFFET A DISTANCE SUR LE CERVEAU	33
1.2.1 EXISTENCE D'UN METABOLISME ENDOVASCULAIRE	33
1.2.1.1 Hypothèse hémoglobine-nitrosothiols	34
1.2.1.2 Hypothèse nitrite / nitrite réductase	34
1.2.2 CERVEAU EN DEVELOPPEMENT	36
1.2.2.1 Développement cérébral	36
1.2.2.1.1 Neurulation	36
1.2.2.1.2 Mise en place des contingents cellulaires et migration.	37
1.2.2.1.3 Quelques déterminants génétiques de la migration neuronale	39
1.2.2.1.4 Croissance axonale et dendritique, synaptogénèse.	40
1.2.2.1.5 Mort cellulaire programmée :	41
1.2.2.1.6 Mise en place des astrocytes	41
1.2.2.1.7 Maturation des oligodendrocytes / myélinisation.	42
1.2.2.1.8 Microglie et macrophages cérébraux	43
1.2.2.1.9 Développement vasculaire	43
1.2.2.2 Vulnérabilité du cerveau en développement : encéphalopathie du prématuré.	44
1.2.2.2.1 Description histologique de la leucomalacie périventriculaire	44
1.2.2.2.2 Imagerie	47
1.2.2.2.3 Pathophysiologie des lésions de substance blanche des prématurés	48
1.2.2.2.3.1 Excitotoxicité et lésions de substance blanche	49

1.2.2.2.3.2	Hypoxie	51
1.2.2.2.3.3	Stress oxydatif	51
1.2.2.2.3.4	Inflammation.	51
1.2.3	Interaction angiogenèse et développement cérébral	53
1.2.3.1	VEGF et angiogenèse	53
1.2.3.2	Autres facteurs d'angiogenèse	54
1.2.3.3	VEGF et développement cérébral	54
1.2.4	Modèles animaux d'effets cérébraux du NO inhalé	Error! Bookmark not defined.
1.2.5	Le devenir neurodéveloppemental des prématurés traités par iNO	
	n'est pas univoque.	56
1.2.5.1	Pronostic neurologique à court terme	56
1.2.5.2	Pronostic neurologique à long terme	56
1.3	Hypothèse de travail.	58
2	PRESENTATION DES RESULTATS ET ARTICLES	59
2.1	Article 1: En préparation Le monoxyde d'azote inhalé augmente l'angiogenèse cérébrale via la cGMP	60
2.2	Article 2 : Nitric oxide plays a key role in myelination in the developing brain.	70
2.3	Article 3 : Neuroprotective effect of inhaled nitric oxide on excitotoxic-induced brain damage in neonatal rat.	77
3	Discussion	84
3.1	Limites des modèles étudiés	85
3.2	Une preuve originale du transport du NO	86
3.3	Mécanismes des effets du NO sur cerveau sain ou lésé	89
3.3.1	Effet transcriptionnel à distance du iNO.	89
3.3.1.1	Effet transcriptionnel du NO : voie NO -> cGMP -> CREB	90
3.3.1.2	Une voie NO -> PDGFRα et Sema-3F ?	91
3.3.1.3	Interaction Thrombospondine-1 / Signalisation par le NO	91
3.3.1.4	Interaction angiogenèse et maturation oligodendrocytaire, neuroprotection	92
3.3.2	Effets non transcriptionnels du NO inhalé ?	94
3.4	Le NO comme médicament ?	94
3.4.1	L'inhalation prolongée de NO n'induit pas de lésion sur le cerveau en développement chez le rat.	95
3.4.2	Les effets du iNO sont-ils dépendants d'un contexte cellulaire ?	95
4	Perspectives :	98
5	Annexes	100
6	Bibliographie	107

ABREVIATIONS

Protéine AE1	Protéine Anion Exchanger 1
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
CNG Channels	Canaux ioniques liant les nucléotides cycliques
CREB	CRE binding protein
CRE	cAMP responsive element
DBP	Dysplasie bronchopulmonaire
EDRF	Endothelial Derived Relaxing Factor
E(n)	Jours de vie embryonnaire (ex E20)
EPO	Erythropoéïtine
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine adénine mononucléotide
FGF	Fibroblast Growth Factor
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GTP	Guanosine triphosphate
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HRE	HIF response element
HTAPPN	Hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau né à terme
iNO	Monoxyde d'azote inhalé
KO	Knock Out
L-NAME	N(G)-Nitro-L-Arginine Methyl Ester
NADPH	Forme réduite du NADP Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxyde synthase
nNOS	NOS neuronale / NOS1
iNOS	NOS inductible / NOS2
eNOS	NOS endothéliale / NOS3
ARNm	Acide ribonucléique messenger

IGF1	Insulin-like growth factor
NF-KB	Nuclear factor-kappa B
PaO2	Pression artérielle en oxygène (mmHg)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PHD	prolines hydroxylases
PKGI	Protéines kinases GMPc-dépendantes
PI-kinases	Phosphatidyl-inositol kinases
P(n)	Jours de vie postnatale (P7)
Ppm	Particules par million
PSD95	Post-synaptic density 95 protein
pVHL	protéine von Hippel Lindau
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
sGC	Guanylate cyclase soluble
SA	semaine d'aménorrhée
SG	semaine de grossesse
TGF	Transforming growth factor
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
TSP	Thrombospondine
VEGF (R)	Vascular endothelial growth factor (Receptor)

I. INTRODUCTION

L'irruption du monoxyde d'azote en physiologie il y a environ 30 ans a eu un impact énorme dans la littérature médicale : dans la seule base de données Medline, plus de 47000 articles y font référence dans leur titre actuellement ¹. Les propriétés du monoxyde d'azote ont largement dépassé le champ de la physiologie vasculaire.

Le travail qui va vous être présenté aborde les effets cérébraux du monoxyde d'azote inhalé, sur le cerveau en développement du raton. Ce thème relève d'une problématique clinique : le monoxyde d'azote est assez largement utilisé par voie inhalée chez le nouveau-né, pour ses effets locaux sur la circulation pulmonaire et potentiellement le développement alvéolaire. Or, un transport intravasculaire du monoxyde d'azote existe. Les effets de l'inhalation de monoxyde d'azote sur un cerveau en développement ne sont pas connus.

L'introduction comprend deux parties.

D'abord nous aborderons les connaissances « classiques » autour du monoxyde d'azote, depuis sa découverte jusqu'à son utilisation chez le prématuré.

Ensuite nous détaillerons les possibilités d'un effet cérébral du monoxyde d'azote inhalé, en exposant les travaux sur le métabolisme endovasculaire du monoxyde d'azote, en précisant les enjeux sur la cible que sont le cerveau en développement et les lésions cérébrales de la prématurité. Enfin nous détaillerons les interactions entre le développement vasculaire et le développement cérébral.

¹ « nitric oxide »[Title]

1.1 DE LA NITROGLYCERINE A LA DYSPLASIE BRONCHOPULMONAIRE

1.1.1 DECOUVERTE DU NO EN PHYSIOLOGIE VASCULAIRE

Fin des années 70. L'acétylcholine est connue depuis longtemps comme un vasodilatateur *in vivo*. Pourtant, Robert F. Furchgott et John V. Zawadzki ne parviennent pas à retrouver *in vitro* cet effet vasodilatateur. Ils travaillent sur des pièces d'aorte descendante chez le lapin. Dans ce modèle l'acétylcholine entraîne curieusement une vasoconstriction, et seulement à des doses très supérieures aux concentrations physiologiques.

En observant les pièces anatomiques et en variant les procédés de préparation des pièces, ils s'aperçoivent que l'acétylcholine induit une vasodilatation si et seulement si la couche endothéliale est préservée. Ils démontrent l'existence d'une transmission paracrine du signal acétylcholine de la cellule endothéliale à la cellule musculaire. L'article est publié dans Nature en 1980 : "The Obligatory role of endothelial cells in the relaxation of artériel smooth muscle by acetylcholine". (Furchgott & Zawadzki 1980). A la recherche de ce facteur paracrine, différentes molécules sont testées dans leur article: le GMPc et l'AMPc n'entraînent qu'une réponse partielle. Le nitrate de sodium et le glycérl trinitrite entraînent une vasodilatation marquée.

En 1984 Griffith précise la biochimie de ce qui est alors surnommé le "Furchgott Factor": il décrit un "EDRF" (Endothelial Derived Relaxing Factor) instable, diffusible, qui agit via stimulation de la guanylate cyclase soluble (sGC), est inhibé par l'hémoglobine et le bleu de méthylène (Griffith et al. 1984).

En 1986, l'équipe de Salvador Moncada publie une approche différente, inspirée des techniques de milieux conditionnés en culture cellulaire et de la chromatographie (Gryglewski, Moncada, et al. 1986a). Une culture de cellules endothéliales d'aorte de porc est développée sur microbilles, et le surnageant est utilisé pour perfuser en cascade des fragments aortiques dénués d'endothélium. Cette approche permet deux observations: l'implication de l'anion superoxyde dans l'inhibition de l'EDRF (Gryglewski, Palmer, et al. 1986b); et la forte suspicion que EDRF est un radical libre.

Quelques années avant, les travaux sur les propriétés des dérivés nitrés avaient fait le lien entre vasodilatation et monoxyde d'azote. Depuis la deuxième moitié du 19^e siècle on prescrivait de la nitroglycérine contre l'hypertension artérielle ou l'angor (travaux de Brunton, de Murrell)(N. Marsh & A. Marsh 2000). En 1977, Ferid Murad démontre la formation de monoxyde d'azote au cours de la dégradation de la nitroglycérine. La même année on montre que le NO est le ligand de la guanylate cyclase soluble (Arnold et al. 1977; Craven & DeRubertis 1978). Sa liaison déclenche une augmentation de la GMPc (Katsuki et al. 1977).

Ignarro montre en 1980 que les dérivés nitrés entraînent la formation de NO et une vasodilatation (Ignarro et al. 1981).

Furchgott propose au cours d'un symposium en 1987 que le NO pourrait être cet EDRF, il le publie en 1988 (Furchgott 1988). Richard Palmer et Moncada en 1987 parviennent à perfuser du NO en solution aqueuse et montrent rapidement l'analogie pharmacologique entre le NO et EDRF (Palmer et al. 1987). Dans la même année, Ignarro identifie également le NO à l'EDRF (Ignarro et al. 1987). Moins de deux ans plus tard, la production de NO et les Nitric Oxide Synthases sont identifiées dans l'endothélium, le cerveau et les macrophages, et la voie métabolique du NO, de la L-arginine jusqu'au cGMP est largement dessinée (Hibbs et al. 1987; Iyengar et al. 1987; Moncada et al. 1989).

Furchgott, Murad et Ignarro recevront le prix Nobel en 1998.

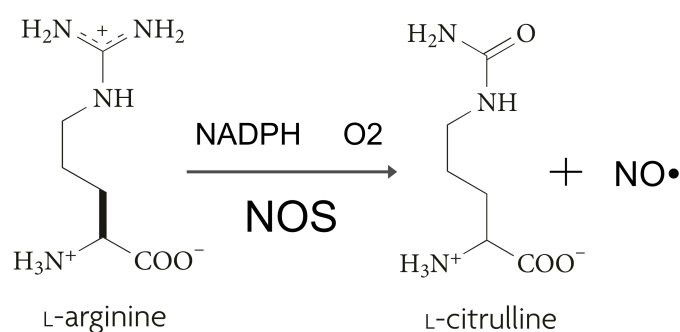
1.1.2 METABOLISME DU NO ENDOGENE

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz, inodore, incolore, à température ambiante, relativement insoluble dans l'eau. Le NO est connu de longue date comme un gaz-déchet de l'industrie et de la pollution atmosphérique, sa concentration naturelle dans l'air est comprise entre 0,01 et 0,5ppm et jusqu'à 1,5ppm à proximité d'un trafic routier intense (Griffiths & Evans 2005).

Formé d'une double liaison covalente entre un atome d'azote et un atome d'oxygène, le monoxyde d'azote possède un électron non lié, d'où sa très grande réactivité avec d'autres radicaux libres, certains ions métalliques et certains acides aminés.

Deux caractéristiques du NO sont essentielles en biologie moléculaire: sa diffusibilité et sa réactivité.

Figure 1.1 : Synthèse du NO à partir de L-arginine.



1.1.2.1 Les Nitric Oxide Synthases.

Les nitric oxide synthases catalysent l'oxydation de l'acide aminé semi-essentiel L-Arginine en L-Citrulline, via deux mono-oxygénations successives (production intermédiaire de N-hydroxy-L-arginine). Deux moles de dioxygène et 1.5 mole de NADPH (forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) sont utilisées par mole de NO formée.

Trois isoformes des NOS sont bien connues, elles ont gardé le nom du tissu où elles ont été caractérisées: NOS1/nNOS neuronale, NOS2/iNOS macrophagique ou inducible, NOS3/eNOS, endothéliale. Ce sont des homodimères, leur domaine réductase C-terminal est très semblable au domaine réductase du

cytochrome P450. Leur portion N-terminale contient le domaine oxygénase doté de l'hème et le site de fixation de la L-arginine. En complément des substrats L-arginine et dioxygène, se fixent à l'enzyme la NADPH, la flavine adénine dinucléotide et mononucléotide (FAD et FMN) et la tétrahydrobioptérine. Le flux d'électrons entre les domaines réductase et oxydase est essentiel à la synthèse du NO et fait l'objet d'une régulation par la calmoduline.

Ces 3 enzymes possèdent une séquence consensus de fixation de la calmoduline, mais aux propriétés différentes. Les NOS1 et NOS3 fixent la calmoduline à des concentrations élevées de calcium, c'est à dire lors des afflux intracytoplasmiques de calcium. Elles sont donc dépendantes de la signalisation par le calcium. La NOS2 fixe la calmoduline à des concentrations calciques faibles, son activation est indépendante des flux calciques et elle est opérationnelle dès sa synthèse. La régulation des quantités importantes de NO qu'elle génère est transcriptionnelle, d'où son nom d'inductible. La NOS2 est associée aux phénomènes inflammatoires, sa transcription est activée par les cytokines TNF α , IL1- β , Interféron gamma.

La NOS1 peut être cytosolique ou membranaire, cette localisation participe à la spécificité du signal transmis. Dans le neurone, la NOS1 est activée par les influx calciques régulés par des canaux voltage dépendant, en particulier le récepteur NMDA. La NOS1 peut se lier à ce dernier via la protéine PSD95 (Post-synaptic density 95 protein) et son domaine PDZ. La NOS1 est ainsi en situation d'être exposée aux flux calciques entrants (Brenman et al. 1996). Il existe des variants par épissage de NOS1/nNOS (NOS α et NOS β) qui ne possèdent pas ce domaine PDZ (Garthwaite 2008; Steinert et al. 2010).

La liaison des cavéolines 1 et 3 à la NOS1 fixe cette dernière à la membrane cellulaire et diminue son interaction avec la calmoduline, inhibant la synthèse de NO.

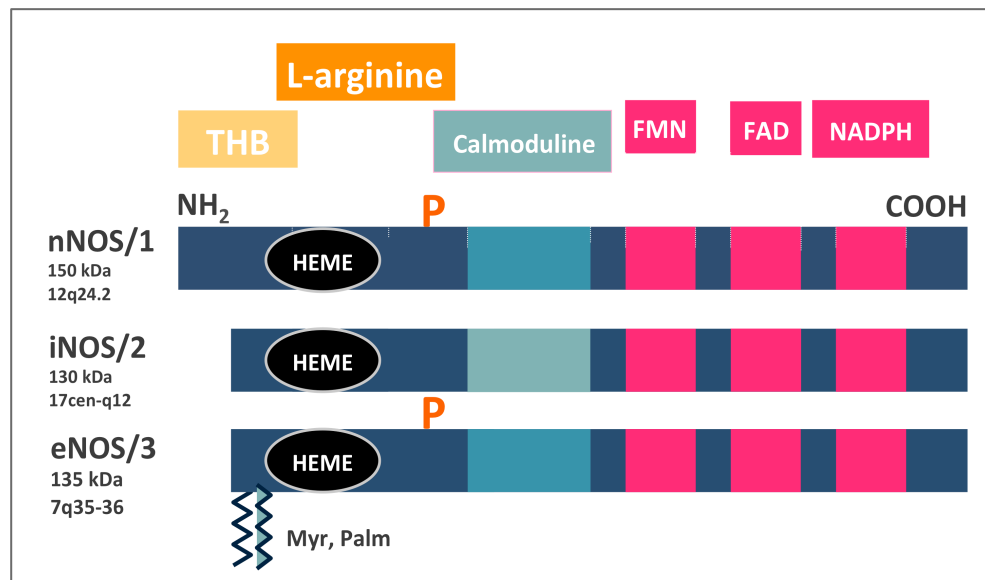
La eNOS est dépendante d'une régulation par phosphorylation (protéine kinase B/Akt). La NOS1 pourrait également faire l'objet d'une régulation par phosphorylation, dont l'implication in vivo n'est pas encore certaine (Garthwaite 2008).

La NOS3 fait l'objet d'acétylation post-transcriptionnelle: palmitoylation, myristilation, qui participent à la fixation membranaire de cette isoforme. Les cavéolines jouent un rôle dans l'activation de la NOS3, à la fois en rapprochant les récepteurs membranaires (aux bradykinines, à l'acétylcholine, à la sérotonine) de la NOS3 dans une cavéole, mais aussi via la liaison et l'activation de la calmoduline (Govers & Rabelink 2001). Enchâssée dans la bicouche lipidique la NOS3 interagit avec la signalisation sphingolipidique.

Enfin, une quatrième forme de Nitric Oxide Synthase semble exister au sein de la mitochondrie. En 1997, Ghafourifar isole la production de NO dans la mitochondrie, dans le foie de rat (Ghafourifar & Richter 1997). La séquence protéique de cette Nitric Oxide Synthase mitochondriale, (mtNOS) n'est pas

connue, et il n'est pas certain qu'il s'agisse d'une isoforme spécifique. Elle partage une grande homologie avec la nNOS. La mtNOS est localisée à la face interne de la membrane interne de la mitochondrie, elle est régulée par l'ion calcium. Nous décrirons plus loin les propriétés du NO au sein de la mitochondrie.

Figure 1.2 : Trois Nitric Oxide Synthases. Conservation des sites de fixation des régulateurs. La fixation de la calmoduline à la NOS2 s'affranchit d'une augmentation de la concentration intra-cellulaire de calcium. NOS1 et NOS3 peuvent être phosphorylées. (d'après Steinert, 2010, et Dinh-Xuan, 2007)



1.1.2.2 Cibles du NO

Le NO est un facteur paracrine par excellence, diffusible, il peut activer facilement des cibles cytoplasmiques dans des cellules adjacentes. Son rayon d'action est limité par sa réactivité avec d'autres radicaux libres, les ions métalliques et les hèmes, certains acides aminés. Il a de fait longtemps été difficile d'estimer sa durée de vie in vivo. La demi-vie du monoxyde d'azote est estimée à quelques millisecondes dans le secteur intravasculaire, il y est catabolisé en nitrate/nitrite ou se fixe à l'hémoglobine (Thomas et al. 2001; Jeffers et al. 2005). Dans les tissus sa demi-vie est de l'ordre de la seconde : 0,9 secondes dans le parenchyme cérébral du rat (Lancaster 1994; Barbosa et al. 2008).

Il existe trois isoformes du NO : l'ion nitrosium (NO⁺), la forme « radical libre » (NO[•]) et l'ion nitroxyl (NO⁻), aux propriétés physiques et biologiques différentes (Stamler, Singel, et al. 1992b; Stamler 1994). La production de ces différentes isoformes dépend de l'état redox, du pH et probablement de l'isoforme de NO Synthase (Thippeswamy et al. 2006).

Parmi les nombreuses cibles du monoxyde d'azote, on rapporte :

- Activation de la Guanylate cyclase soluble et production de cGMP ;
- Interaction avec le Cytochrome du complexe IV mitochondrial et interaction avec le métabolisme mitochondrial ;
- Nitrosylation de Groupements thiols de protéines (Stamler et al. 2001) ;
- Signalisation Redox, protéines de la famille ras ;
- Interaction avec le facteur NF- κ B ;
- Facteur HIF-1 et modulation de la signalisation hypoxique ;
- Activation des caspases ;
- A haute concentration et selon le « contexte oxydatif » cellulaire: formation de peroxydinitrite, liaison à l'ion superoxyde, intervenant dans les stress oxydatif et nitrosatif.

On retrouve souvent associé au monoxyde d'azote les termes de « Janus-faced molecule » ou « double-edge sword ». Schématiquement on connaît au NO deux niveaux de fonctionnement en physiologie :

- A faible concentration, et produit par les nNOS/NOS1 ou eNOS/NOS3, le NO peut-être un second messager, un régulateur de métabolisme ou d'activités transcriptionnelles ;
- A grandes concentrations, et/ou en fonction du « contexte redox » cellulaire, le NO exerce des effets toxiques médiés par l'anion superoxyde, ou le stress oxydatif. C'est l'intérêt de l'activation de la NOS2/iNOS – dont la régulation est transcriptionnelle - dans les macrophages pour détruire les micro-organismes étrangers par exemple.

Cette dualité du NO, fonction de sa concentration et du contexte cellulaire, est une notion fondamentale dès que l'on envisage son utilisation pharmacologique.

1.1.2.3 La Guanylate cyclase soluble.

Elle appartient à une nombreuse famille de protéines catalysant la formation de cGMP à partir de GTP. Il en existe deux formes : membranaire et soluble. La deuxième est la principale cible du NO et de ses dérivés comme le nitroprusside, les nitrates organiques. La Guanylate Cyclase soluble (sGC) est une hémoprotéine avec pour ligand naturel le NO. C'est un hétérodimère, avec une sous-unité α , une sous-unité β . La forme prédominante 11 est ubiquitaire,

la forme 22 est présente dans l'utérus, le placenta, le cerveau. La portion C-terminale, très conservée, exerce l'activité catalytique. La portion N-terminale des deux sous-unités est nécessaire à la régulation par le NO. L'hème de la sGC est de structure très semblable à l'hème de la deoxyhémoglobine ou de la deoxymyoglobine. Son affinité pour le NO est très supérieure à celle pour l'oxygène. La fixation du NO libère le site catalytique et induit la formation rapide et abondante de cGMP, multipliant sa V_{max} d'un facteur 200 à 400 (Tsai & Kass 2009).

Le signal "NO" est amplifié en un signal "cGMP". En aval, plusieurs cibles :

- Les protéines kinases cGMP dépendantes ;
- Les canaux ioniques liant les nucléotides cycliques (CNG Channels) ;
- Les phosphodiesterases.

1.1.2.4 Protéines kinases cGMP-dépendantes

Les protéines kinases dépendantes de cGMP sont des homodimères, avec activité de sérine/thréonine kinase. On dénombre trois isoformes, PKGI, PKGI β (produites par épissage alternatif) et PKGII.

La région carboxy-terminale contient le domaine catalytique et fixe la protéine substrat et l'ATP. Chaque sous-unité porte une séquence pseudo-substrat qui inhibe le site catalytique. La liaison du cGMP induit une modification conformationnelle, une "ouverture" du site catalytique et, pour les PKGI, une autophosphorylation.

Les cibles de ces kinases sont nombreuses et diffèrent largement selon le type cellulaire et le "contexte" de chaque cellule (différenciation, activation...). A cette étape, la signalisation par le NO via le cGMP est spécifique de chaque cellule. En aval, la cascade de phosphorylation débouche en règle sur l'activation ou l'inhibition de facteurs de transcription.

1.1.2.5 Canaux ioniques liant les nucléotides cycliques (CNG Channels)

Hétérotétramère percé d'un pore central, la perméabilité de ce canal aux cations dépend de la fixation d'un nucléotide cyclique. Certains sont spécifiques du cGMP. Les hélices transmembranaires qui le constituent changent de conformation à la liaison de l'AMPc ou du GMPc. Ces canaux sont impliqués dans la perception sensorielle (cellules rétinienne, olfactive), mais également retrouvés dans le rein, le myocarde, la glande pinéale, le testicule. Semblant peu impliquée dans ce travail, cette cible du cGMP ne sera pas détaillée davantage.

1.1.2.6 Phosphodiesterases

Les phosphodiesterases clivent le cGMP (ou cAMP) qui se lie à elles. Il en existe 11 familles comprenant des isoformes et des variants par épissage, leur point commun est la conservation d'un domaine catalytique possédant deux séquences de liaison à l'ion Zinc, en tandem (Bender & Beavo 2006). Elles définissent en partie le taux de cGMP intracellulaire et sont étroitement régulées: selon le type de phosphodiesterase, la régulation s'effectue via phosphorylation, la voie calcique, modification allostérique à la fixation du substrat, localisation cellulaire... En fonction du tissu, les familles de phosphodiesterases 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10 ont une grande affinité pour l'hydrolyse préférentielle du cGMP (versus cAMP) (Garthwaite 2008).

1.1.2.7 Intégration de la signalisation NO-cGMP : Relaxation de la fibre musculaire lisse

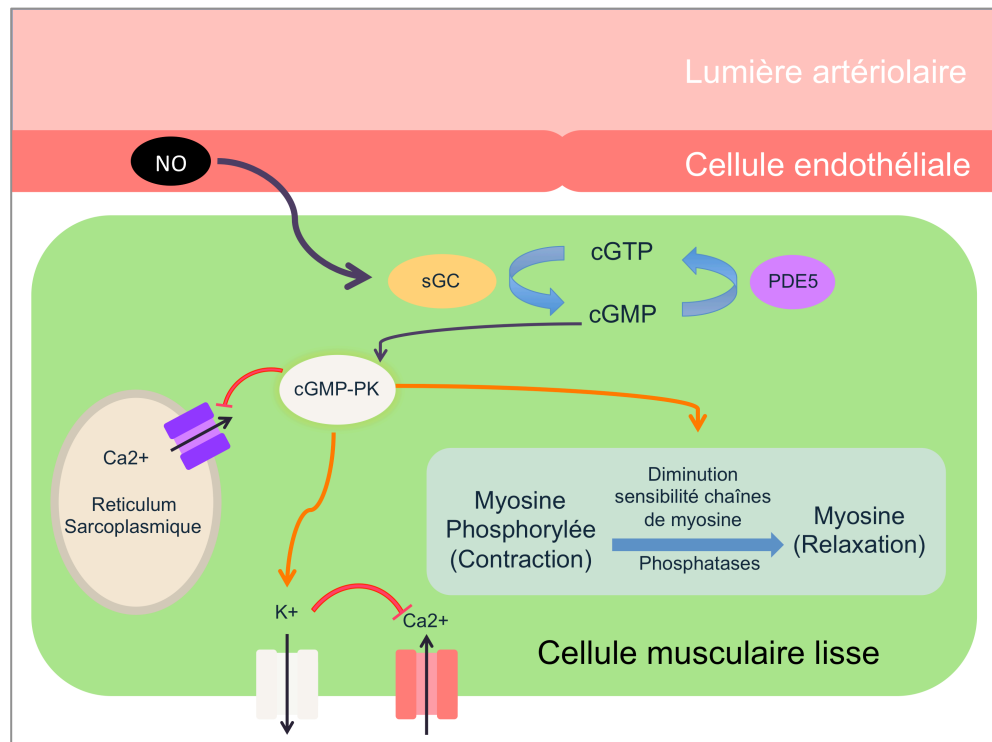
L'exemple typique de cette signalisation par le NO est la relaxation de la fibre musculaire lisse vasculaire.

Les molécules de NO synthétisées par la eNOS de la cellule endothéliale activent les sGC des cellules musculaires lisses adjacentes. Cette voie est essentielle puisque l'inactivation de la sGC abolit la vasodilatation NO-dépendante (Lunardi et al. 2007).

La relaxation de la cellule musculaire lisse est plurifactorielle :

- Diminution de la concentration de calcium cytoplasmique. Des protéines kinases G (PKG) vont phosphoryler et activer les phosphatidyl-inositol kinases (PI-kinases), ces dernières activent les pompes Ca^{2+} /ATPase ;
- Inhibition des canaux calciques. Les PKG activent les canaux potassiques, s'ensuit une hyperpolarisation membranaire inhibant les canaux calciques voltage dépendants, de la membrane cellulaire et du réticulum sarcoplasmique ;
- Désensibilisation du système contractile au calcium. Des protéines kinases G modifient l'équilibre des kinases/phosphatases responsables de la phosphorylation des chaîne légères de myosine. La diminution de la phosphorylation rend le système contractile moins sensible au calcium. L'inhibition des rho-kinases par des protéines kinases G joue un rôle similaire ;
- Diminution du nombre de liaisons cytosquelette/myosine. La phosphorylation de protéines des ligaments fins du cytosquelette diminue la liaison de ce dernier à la myosine.

Figure 1.3 : Intégration d'une signalisation par le NO : Relaxation de la fibre musculaire lisse vasculaire. (d'après Griffiths et al, NEJM 2005)



1.1.2.8 Signalisation par le NO et régulation de la transcription

Trois mécanismes permettent au NO d'influencer la transcription :

- La signalisation cGMP
- L'interférence avec la signalisation hypoxique (HIF-1)
- Les modifications post traductionnelles de certains facteurs de transcription par nitrosylation.

Certaines PKG cGMP-dépendantes possèdent une séquence d'adressage au noyau (nuclear location sequence), démasquée à l'activation par changement conformationnel. Les cibles transcriptionnelles du NO varient en fonction du type cellulaire, mais sont souvent impliquées les voies de signalisation de prolifération cellulaire, d'hypoxie, d'apoptose. Ainsi :

- Le facteur de transcription CREB (CRE binding protein, CRE pour cAMP responsive element) est activé et phosphorylé par des PKG-cGMP dépendantes. Ce facteur est notamment impliqué dans la survie et la prolifération cellulaires. Les facteurs de transcription ATF-1 et TFII-I sont activés de manière similaire.
- Le NO induit l'expression de c-fos et jun B qui forment le facteur de transcription AP-1 impliqué dans la signalisation hypoxique.

- Enfin le NO intervient aussi dans la signalisation apoptotique, il peut diminuer ou augmenter la transcription de NF- κ B.

1.1.2.9 NO et S-nitrosylation

Grâce à son potentiel redox, le NO peut se lier à de nombreux sites nucléophiles : groupe alcool, aromatique, amine, thiol.

La réaction de S-nitrosylation est la liaison covalente d'un groupement NO sur le groupement thiol d'un résidu cystéine. Cette réaction s'effectuerait le plus souvent par trans-nitrosylation, le groupement NO étant transféré d'un groupe thiol à un autre. Cette trans-nitrosylation peut modifier les capacités des protéines-cibles, qui sont nombreuses :

- Kinases,
- Récepteurs et canaux,
- Protéines de structure,
- Facteurs de transcription,
- Protéases,
- Certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (Stamler et al. 2001).

Trois types de réaction aboutissent à la formation de S-nitrosothiols à partir de NO:

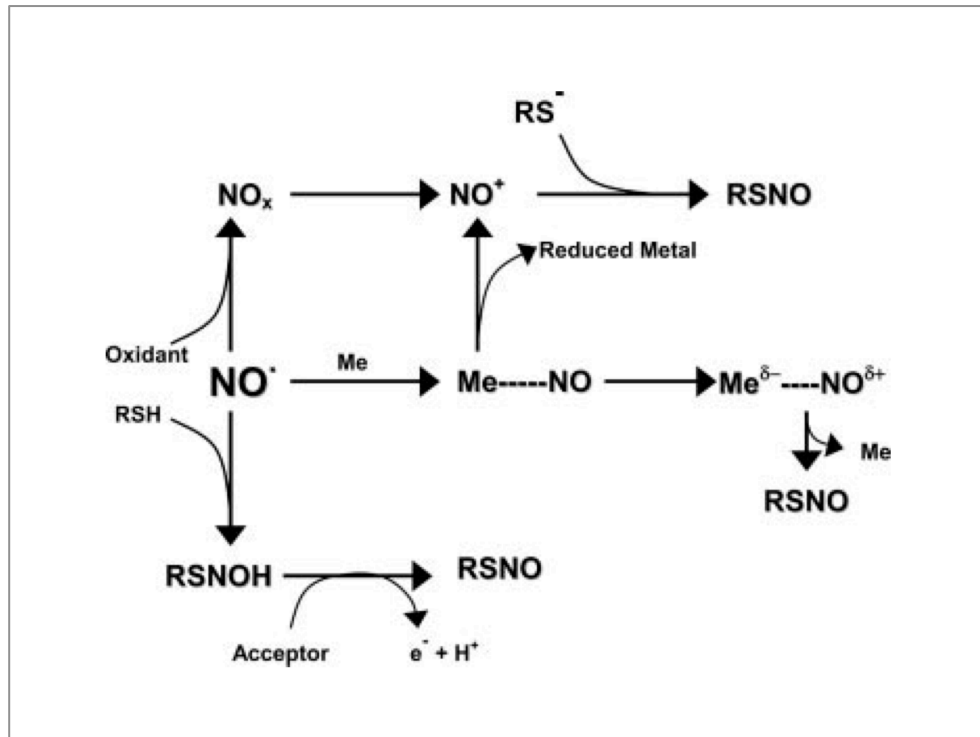
- Par oxydation du NO en nitrite, nitrate, peroxyxynitrite, en présence de grandes quantités d'oxygène et de NO ;
- Réaction directe par soustraction d'un électron ;
- Catalyse, notamment par des protéines possédant des cations métalliques comme l'hémoglobine et la céruloplasmine. Il existe également des nitrosylases comme les GAPDH nitrosylées (SNO-GAPDH) (Gow et al. 2004).

La nitrosylation des cystines n'est pas due au hasard, mais spécifique de certains résidus cystine. Les cystines nitrosylées sont encadrées par des séquences d'acides aminés particulières : succession d'acides aminés acides et basiques, ou groupement d'acides aminés hydrophobes.

Deux systèmes de dénitrosylation existent : la thioredoxine et la voie du glutathion. Ce dernier, sous la forme S-nitrosoglutathion, est en équilibre avec les protéines nitrosylées. La S-nitrosoglutathion réductase catalyse la transformation du S-nitrosoglutathion en glutathion, déplace l'équilibre SNOG-

SNOprotéines et diminue de façon non spécifique le degré de nitrosylation protéique dans la cellule.

Figure 1.4 : Réactions de S-Nitrosylation (d'après Gow et al, 2004)



Il existe également la réaction de nitration des résidus tyrosine, qui consiste en la greffe de groupe « nitro » ($-\text{NO}_2$) sur le composé aromatique d'une tyrosine. Il s'agit au minimum d'un marqueur de stress oxydatif. On ne connaît pas à l'heure actuelle un véritable rôle de « signalisation cellulaire » à cette modification post-transcriptionnelle, mais elle peut modifier la fonction protéique (Radi 2004). Les métalloprotéinases, myéloperoxydases, Mn superoxyde dismutase catalysent cette réaction. Elle ne semble pas réversible, mais contrôlée par dégradation protéique (Gow et al. 2004; Abello et al. 2009)

1.1.2.10 NO et stress oxydatif/nitrosatif

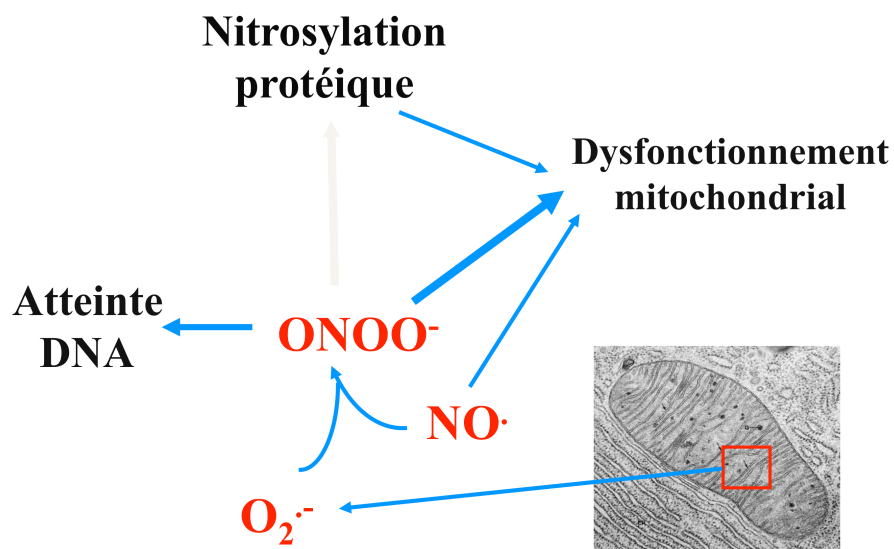
A haute concentration et en contexte cellulaire favorable (haut potentiel redox), le catabolisme du NO produit de nombreux radicaux libres. Les radicaux nitrogénés comprennent le NO, le dioxyde d'azote (NO_2) et le nitrite (NO_2^-), les trioxides et tetroxides (N_2O_3 et N_2O_4), les S-nitrosothiols, l'anion peroxynitrite (ONOO^-) et les complexes fer-dinitrosyl. Les radicaux libres sont des intermédiaires de la réduction de O_2 en H_2O . On connaît le superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion hydroxyle (OH^-).

Parmi les enzymes qui catalysent la formation de ces radicaux, on retrouve les NO-synthases, les cyclooxygénases, les NADPH oxydases, les myéloperoxydases. La chaîne respiratoire mitochondriale produit la majorité (90%) des radicaux libres en physiologie.

Parmi les accepteurs de ces radicaux libres se trouvent les superoxyde dismutases (SODs), dont on distingue trois isoformes et localisations: SOD1 ou Cu/ZnSOD, cytosolique ou nucléaire, SOD2 ou MnSOD mitochondriale et SOD3-Cu/ZnSOD extracellulaire. Les glutathion peroxydase et catalase complètent le système de défense, avec les antioxydants cellulaires suivants: le glutathion, l'ascorbate, le α tocophérol.

Le NO réagit rapidement avec les autres composés possédant un électron libre. En compétition avec la SOD, le NO réagit avec l'oxygène pour former l'ion peroxydinitrite puis le radical hydroxyle. Les composés intermédiaires NO_2 et CO_3 hautement toxiques sont formés.

Figure 1.5 : Participation du NO au stress oxydatif/nitrosatif



Les radicaux libres entraînent des dommages de la double hélice d'ADN, des dysfonctions enzymatiques, et surtout une peroxydation lipidique. Cette peroxydation désorganise la membrane plasmique et les organelles intracellulaires au premier rang desquels la mitochondrie. Cette dernière relargue le cytochrome C dans le cytosol et l'apoptose Caspase 3-dépendante est déclenchée.

1.1.2.11 NO, hypoxie, interférences avec la signalisation HIF-1

Le métabolisme aérobie implique de fait une dépendance à l'oxygène, et des mécanismes adaptatifs en situation d'hypoxie. Au cœur de cette régulation se trouve la signalisation hypoxique médiée par HIF-1. Il s'agit d'un facteur de transcription, hétérodimérique, composé d'une sous-unité β , dans le nucléosome et d'une sous-unité α , objet d'une régulation dans le cytosol en fonction de l'oxygène disponible. En présence d'oxygène, des prolines hydroxylases (PHD) catalysent l'hydroxylation de résidus proline de HIF α . Cette dernière est alors reconnue par la protéine Von Hippel Lindau (pVHL), ubiquitinylée et dégradée dans le protéasome.

En situation d'hypoxie, l'hydroxylation de HIF-1 α n'a pas lieu, cette sous-unité n'est plus dégradée, s'accumule et transloque dans le plasma et dimérise avec la sous-unité HIF-1 β . HIF-1 $\alpha+\beta$ se lie aux régions HRE (HIF response element). Parmi les gènes régulés, sont activés en particulier des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, l'angiogenèse, l'érythropoïèse (ex VEGF, angiopoïétine-1, EPO).

Le NO interfère avec la dégradation de HIF-1 α par la voie des S-nitrosothiols. La S-nitrosylation de HIF1- α inhibe la fixation de la protéine Von Hippel Lindau. Cette dernière peut également être directement S-nitrosylée ce qui l'inhibe. Ces deux S-nitrosylations protègent HIF1- α de l'ubiquitinylation et favorise la transcription induite par HIF1- α .

Les enjeux de cette interférence NO-HIF1- α sont encore mal expliqués. Les S-nitrosylations peuvent stabiliser HIF1- α en l'absence d'hypoxie cellulaire. Cela a été décrit en situation d'anémie chronique (Ho et al. 2012). Le transport en oxygène est compensé par l'augmentation du débit sanguin. L'apport d'oxygène au tissu, la saturation en oxygène de l'hémoglobine (SaO₂) et la pression partielle en oxygène sont normales. Nous le verrons plus loin, le NO est métabolisé de manière réversible par l'hémoglobine. Schématiquement, par ce biais il est possible qu'il soit le signal d'une hypoxie «à l'échelle de l'organisme» comme dans la situation d'une anémie et mette en jeu la signalisation «hypoxique». Cette dernière aboutit entre autres à la synthèse d'Erythropoïétine.

1.1.2.12 NO et métabolisme mitochondrial

Le NO module l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, en particulier les complexes I et IV. Il pourrait être produit dans le cytoplasme par des NOS à proximité de la mitochondrie, ou généré à partir de S-nitrosothiols. Le NO pourrait également être produit in situ à partir des NOS mitochondriales, à la face interne de la membrane interne mitochondriale.

Le NO se lie au cytochrome C de la chaîne respiratoire en compétition avec l'oxygène, et peut inhiber le flux d'électron de la chaîne respiratoire. Cette inhibition du cytochrome C-oxydase du complexe IV est rapide, réversible et survient à des concentrations nanomolaires de NO. La nitrosylation du

cytochrome est un autre mécanisme d'inhibition connu. Ces deux mécanismes, nitrosylation et liaison à l'hème, coexistent en équilibre selon la conformation du cytochrome, les concentrations en NO et en oxygène. Cette inhibition du cytochrome C conduit à diminuer la consommation de dioxygène par la cellule et à en augmenter la concentration cytoplasmique.

Le complexe I (NADH-ubiquinone-oxydoréductase) est une enzyme de 46 sous-unités, point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Elle existe sous une forme A « Active » et D « Dormante » en fonction de la liaison au NADH et de la concentration locale en oxygène. Son inhibition survient après une exposition plus prolongée au NO, à des concentrations élevées (Clementi et al. 1998). Ce processus implique une S-nitrosylation de la sous-unité ND3. Les réactions de nitrosylation survenant lors de la conformation A de l'enzyme modifient peu son activité. En revanche en conformation D, la nitrosylation de la cystéine exposée inhibe complètement l'enzyme (Gavrikova & Vinogradov 1999).

La myoglobine cytoplasmique est un modulateur de la concentration du NO cytoplasmique. Très affine pour le NO en situation normoxique, elle le catabolise rapidement via son hème. En situation hypoxique, elle peut exercer une fonction de nitrite réductase et générer du NO à partir de Nitrate/Nitrite. Généré à proximité de la mitochondrie, ce NO peut y diffuser rapidement.

L'effet positif ou négatif, « délétère » ou « protecteur » de cette modulation de la chaîne respiratoire n'est pas univoque (Sarti et al. 2011). En cas d'ischémie transitoire, l'inhibition du complexe I diminue la synthèse de radicaux libres (Dezfulian et al. 2009). En revanche si l'effet inhibiteur du NO se prolonge, la pénurie d'ATP compromet la survie cellulaire.

Le NO dans la mitochondrie interfère enfin avec l'apoptose. En catalysant la transformation de l'ion superoxyde en peroxynitrite, il induit un stress oxydatif ou nitrosatif qui entraîne le relargage du cytochrome C dans le cytoplasme. A l'inverse en S-nitrosylant la caspase 3, le NO peut inhiber l'initiation de l'apoptose.

1.1.2.13 Signalisation par le NO dans le système nerveux central

Dès 1988, Garthwaite démontre que la stimulation par le NMDA de neurones cérébelleux libère une molécule aux caractéristiques superposables à l'EDRF ou NO (Garthwaite 2008). Depuis, on a montré que la contribution du NO à la transmission synaptique pouvait être

- Pré synaptique, en modulant la libération de neurotransmetteurs,
- Synaptique, comme neurotransmetteur,
- Post synaptique, comme second messenger, ainsi que l'a suggéré Garthwaite (Garthwaite 2008).

A l'étage présynaptique, le NO stimule le relargage d'acétylcholine (dans le nucleus accumbens), de noradrénaline et de glutamate dans l'hippocampe, de sérotonine et de dopamine dans l'aire préoptique (chez le rat). L'action sur le relargage de GABA dépend de la concentration du NO : inhibition à faibles doses de NO, activation à hautes doses.

Les propriétés du NO, diffusibilité et réactivité, en font un neurotransmetteur original : il est synthétisé sur demande, sans stockage connu. Sa diffusibilité l'autorise à toucher rapidement le neurone post synaptique, mais aussi d'autres neurones (ou autres types cellulaires) autour de la synapse.

Autre propriété remarquable: l'importante amplification du signal, qui repose aussi sur l'affinité de son récepteur sGC. La synthèse d'un petit nombre de molécules de NO va générer une production importante de cGMP dans le neurone post-synaptique, mais éventuellement aussi dans les cellules adjacentes.

Les cellules astrocytaires ou gliales sont exposées à cette diffusion du NO, ce qui peut participer à leur activation et à l'adéquation de la production d'énergie en fonction de l'activité d'un réseau neuronal (Iadecola 1997).

Comme développé ci-dessus, la nNOS associée au récepteur NMDA est activée par l'influx calcique et le NO agit comme second messenger (Toda & Herman 2005).

Le NO peut également être impliqué comme neurotransmetteur classique, synthétisé en pré-synaptique et relargué dans l'espace synaptique.

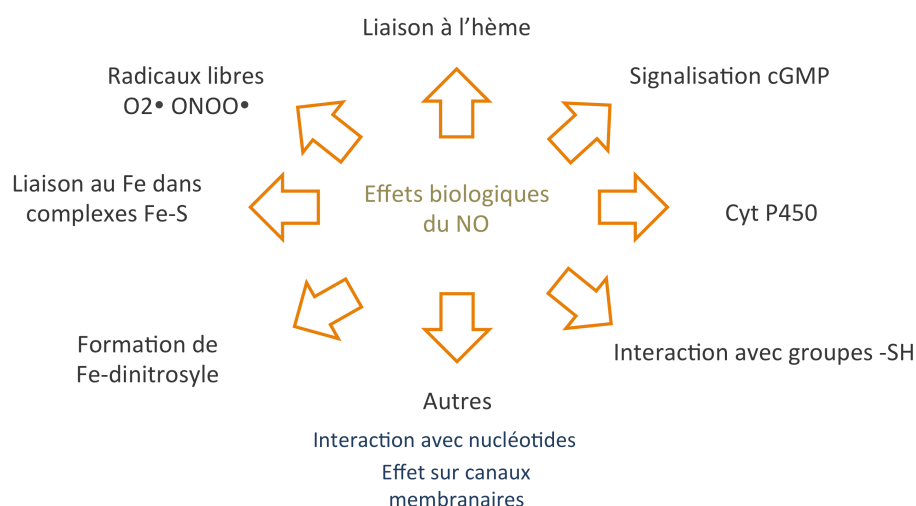
Produit par le neurone présynaptique ou les interneurons, le NO induit une dépression à long terme (long term depression) dans des synapses cérébelleuses ou striatales. Produit par le neurone post synaptique le NO par diffusion peut induire une potentiation à long terme de synapses corticales ou hippocampales (Bon & Garthwaite 2003). Ces effets sur la plasticité synaptique impliquent la voie de la guanylate cyclase soluble, les PKG et des phosphorylations en cascade (Garthwaite 2008; Paul & Ekambaram 2011; Ekambaram 2011).

Certains récepteurs au glutamate, notamment des récepteurs NMDA, sont couplés à une signalisation par le NO, qui officie comme second messenger. En cas de stimulation prolongée et soutenue du récepteur, les sous-unités NR1 et NR2 subissent une S-nitrosylation, ce qui diminue leur activité, et l'influx calcique (Jaffrey et al. 2001). En situation pathologique de surstimulation par le glutamate, comme dans le processus d'excito-toxicité, le NO participe à un certain degré de neuroprotection par cette voie.

De même le NO peut induire la S-nitrosylation du site catalytique des caspases et inhiber la voie de l'apoptose dépendante des caspases (L. Liu & Stamler 1999).

Ces effets potentiellement neuroprotecteurs sont à contrebalancer avec les effets délétères du peroxynitrite et ses dérivés produits à forte concentration de NO.

Figure 1.6 : résumé des principales réactions biologiques du NO.



1.1.2.14 NO comme second messenger du VEGF, Thrombospondine

Le NO agit comme second messenger du VEGF en aval des récepteurs VEGFR1/VEGFR2. Il agit ensuite par la voie de la guanylate cyclase soluble, production de GMP cyclique, et transcription de facteurs pro-angiogéniques.

La recherche sur l'angiogenèse en cancérologie a pointé le rôle d'un puissant régulateur de la voie VEGF/NO : la thrombospondine 1. Cette voie fait l'objet de développements pharmacologiques, actuellement en essai de phase 2 (Nabors et al. 2010; Baker et al. 2008).

Parmi les 5 thrombospondines connues, les isoformes 1 et 2 sont des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse. TSP1 semble plus impliquée dans le développement et les processus précoces d'angiogenèse/cicatrisation (Bornstein 2009). In vitro, l'inhibition de la TSP1 sur des explants musculaires entraîne une augmentation de l'angiogenèse (Isenberg et al. 2005). Même effet in vivo chez des souris déficientes en TSP1 (Wang et al. 2003; Malek & Olfert 2009). L'utilisation d'agonistes TSP-1 inhibe la signalisation du NO dépendant de la voie cGMP (Isenberg et al. 2005). Il existe de nombreux ligands aux thrombospondines dans la matrice extracellulaire et les différents types cellulaires (Isenberg, Frazier, et al. 2008a).

Deux récepteurs membranaires sont impliqués dans la régulation de l'angiogenèse par la thrombospondine 1 : CD36 et CD47, la signalisation via CD36 nécessitant la liaison à CD47. TSP1 inhibe la voie NO en inhibant la sGC et les protéines kinases activées par cGMP. Sur le vaisseau, à long terme il en résulte une inhibition de l'angiogenèse, à court terme une diminution de perfusion tissulaire et une facilitation de l'agrégation plaquettaire.

La recherche s'est focalisée sur les implications endothéliales de TSP1. Son élévation est retrouvée également dans l'athérosclérose, le diabète et les processus liés au vieillissement. Les implications de TSP1 dans d'autres tissus sont encore méconnues (Isenberg, Frazier, et al. 2008a; Isenberg, Yu, et al. 2008b).

1.1.3 UTILISATION DU NO EN NEONATOLOGIE

1.1.3.1 *NO dans l'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né à terme*

A l'instar de la réanimation adulte, le NO a rapidement été utilisé par voie inhalée en néonatalogie. Le NO inhalé induit une relaxation des artérioles pulmonaires, diminue les résistances artérielles pulmonaires et la pression artérielle pulmonaire. Ce qui en fait une thérapeutique intéressante dans l'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau né à terme (HTAPPN), où persiste une vasoconstriction artérielle pulmonaire régionale et étendue. En 1992 deux articles du Lancet (Kinsella et al. 1992; J. D. Roberts et al. 1992) rapportent, sur deux petites séries de nouveau-nés à terme ventilés, une amélioration de l'oxygénation sanguine lors de l'inhalation de 20 à 80ppm de NO. Dans les années suivantes l'utilisation du iNO diminue le recours à l'oxygénation corporelle (Abman & Kinsella 1995; Kinsella & Abman 1996). A partir de 1999 le monoxyde d'azote inhalé reçoit l'aval de la FDA pour le traitement des nouveau-nés hypoxiques avec signes d'hypertension artérielle pulmonaire.

Le NO administré par voie inhalée combine plusieurs avantages :

- Action « topique », directement au contact de la circulation pulmonaire ;
- Amélioration du rapport ventilation/perfusion en vasodilatant les territoires les mieux ventilés ;
- Sélectivité pulmonaire, puisqu'on prêtait au NO une oxydation rapide au contact de l'hémoglobine, et son excrétion sous forme de nitrate (Griffiths & Evans 2005).

1.1.3.2 *Usages pulmonaires du NO inhalé chez le prématuré*

Par extension, chez le prématuré, le NO a initialement été utilisé dans les situations d'hypoxie réfractaire. Il s'est révélé un "traitement adjuvant potentiellement bénéfique" selon Skimming (Skimming et al. 1997) : l'inhalation de 5 à 20ppm de NO pendant quelques minutes s'accompagne d'une augmentation de la PaO₂.

Avant cette époque les stratégies de ventilation agressives étaient nécessaires à la survie immédiate des prématurissimes. La notion de lésions induites par la ventilation émergeait avec les travaux montrant que les baro- et volotraumatismes, l'oxygénothérapie initient une inflammation/fibrose pulmonaire, des lésions emphysémateuses, aboutissant à la dysplasie bronchopulmonaire ou DBP (Chronic Lung Disease pour les anglo-saxons, plus tard dénommée "ancienne dysplasie bronchopulmonaire", cf. infra). Dans ce contexte le NO se présentait comme un traitement adjuvant en situation

d'hypoxie, voire un outil permettant de limiter l'agressivité de la ventilation mécanique.

A l'ère de la généralisation de la corticothérapie anténatale, de l'utilisation intensive du surfactant, de l'utilisation plus raisonnée de techniques de ventilation (hypercapnie permissive, ventilation non invasive), la DBP a changé de présentation histologique et clinique (Jobe 2011). On a décrit sa physiopathologie comme le développement aberrant d'un poumon très immature en milieu aérien, sous le coup d'agressions multiples (ventilation mécanique, stress oxydatif, inflammation).

1.1.3.2.1 Physiopathologie de la DBP - signal VEGF/NO.

Le développement pulmonaire est classiquement subdivisé en 5 stades : embryonnaire, pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire. Il s'agit d'un continuum de développement qui n'est pas uniforme au sein du parenchyme. L'alvéolisation débute vers 36 semaines d'aménorrhée, s'effectue en grande partie jusqu'à 2-3 ans, mais se poursuit au-delà. Les saccules sont subdivisés par les septa secondaires qui dessinent les alvéoles, augmentant la surface d'échange. Le réseau capillaire se modifie : fusion de capillaires adjacents, amincissement de la barrière alvéolocapillaire (Polin et al. 2011).

Le poumon du prématuré entre 25 et 35 semaines est majoritairement canaliculaire puis sacculaire. Son alvéolisation s'effectue en milieu aérien et non liquidien, sous des régimes de pression différents (\pm ventilation mécanique), souvent en contexte inflammatoire.

Dans la DBP, cette alvéolisation est déficiente. Les signes histologiques de la DBP évoquent un parenchyme inflammatoire et "bloqué" au stade sacculaire :

- Simplification alvéolaire, alvéoles peu nombreuses et de grande taille, par défaut de septation secondaire ;
- Artérioles dysplasiques, distribution aberrante des capillaires ;
- Membrane alvéolo-capillaire épaisse ;
- Voies aériennes moyennes de calibre augmenté ;
- Hypertrophie musculaire des voies aériennes distales. Le calibre des voies aériennes moyennes est augmenté, les voies aériennes distales présentent une hypertrophie musculaire (Jobe 2011; Kinsella, Greenough, et al. 2006b).

Cette anomalie de maturation est plurifactorielle et implique baro- et volotraumatismes, facteurs inflammatoires (IL6), microbiens (mycoplasmes), déficit en facteurs de croissance, vitamines et hormones (Jobe 2011; Kinsella, Greenough, et al. 2006b). Parmi les facteurs de croissance impliqués - et thérapeutiques potentielles - on a décrit l'élastine, le platelet-derived growth

factor (PDGF), les fibroblast growth factors (FGFs), l'Insulin-like Growth Factor (IGF1), les transforming growth factors (TGFs)(Bourbon et al. 2005).

Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) concentre néanmoins l'attention depuis plusieurs années. C'est un facteur essentiel de l'angiogenèse et de la survie des cellules endothéliales. Son inhibition à des stades précis du développement pulmonaire aboutit à une alvéolisation anormale similaire à celle de la DBP (Thébaud & Abman 2007) ou prédispose à la survenue de lésions selon la théorie du "double hit" (Balasubramaniam et al. 2003). Dans des modèles expérimentaux de DBP, des thérapeutiques agonistes de la voie VEGF diminuent la survenue de lésions (Jakkula et al. 2000; Le Cras et al. 2002; D'Angio & Maniscalco 2002).

1.1.3.2.2 NO en prophylaxie de la dysplasie bronchopulmonaire.

Le NO est un effecteur secondaire du VEGF dans le poumon (Papapetropoulos et al. 1997; Ziche et al. 1997; Rudic et al. 1998). In vitro le VEGF augmente l'expression de la eNOS, sa concentration protéique et sa production de NO(Papapetropoulos et al. 1997). In vivo, l'inhibition pharmacologique des eNOS bloque l'effet pro-angiogénique de la voie VEGF/VEGFR. Même effet chez les souris déficientes pour eNOS : elles présentent un défaut d'alvéolisation et des anomalies vasculaires, comme dans la DBP (Rudic et al. 1998).

Dans ce contexte, l'utilisation du NO inhalé va s'avérer concluante sur plusieurs modèles animaux.

En 1999 Howlett utilise un modèle de DBP induite par hyperoxie chez le rat. L'inhalation de 20ppm de NO associé à l'oxygène pur pendant 60 heures diminue l'apoptose et l'inflammation pulmonaires (Howlett et al. 1999).

Tang administre un antagoniste du VEGFR2 (SU-5416) à des rats ce qui induit une raréfaction alvéolaire, une diminution de la eNOS (Tang 2004). L'inhalation de NO dès le lendemain de l'injection et pendant 3 semaines diminue les lésions vasculaires. Dans un modèle de DBP par hypoxie chez des souris KO eNOS (Balasubramaniam et al. 2006), l'administration de NO inhalé pendant 21 jours restitue une architecture alvéolaire et vasculaire normale. Toujours dans l'équipe de Steve Abman, dans un modèle par inhibition de VEGF (SU-5416), l'inhalation de NO diminue l'apoptose des cellules endothéliales (Tang et al. 2007).

Les résultats sont les mêmes dans un modèle de DBP chez le primate babouin où l'inhalation de 5ppm de NO pendant 14 jours corrige des lésions histologiques typiques (dépôt d'élastine) et améliore la fonction pulmonaire (McCurnin et al. 2005).

Dulak et Jozkowicz ont montré que Le NO pouvait induire l'augmentation du VEGF (Dulak & Józkwicz 2002). La stabilisation de HIF-1 (protéine et mRNA) en serait responsable (Han & Stewart 2006).

En résumé, le VEGF via une cascade VEGFR2, eNOS, NO, est un acteur majeur de l'angiogenèse pulmonaire et de l'alvéolisation. Le blocage de cette signalisation induit des lésions typiques de DBP. Chez plusieurs modèles animaux, l'inhalation de NO prévient ou corrige de telles lésions. Les essais cliniques d'inhalation de NO reflètent cette évolution : à mesure de notre connaissance de la DBP, nous sommes passés d'un traitement "de sauvetage", adjuvant d'une ventilation invasive, pour limiter les pressions et besoins en oxygène à une conception prophylactique, de maturation. Pour autant, dans cette indication les bénéfices cliniques ne sont pas démontrés. A ce jour, le iNO n'a pas fait la preuve de son efficacité en prévention de la DBP, et n'est pas recommandé par le NIH (National Health Institute)(Cole et al. 2011). Dans la méta-analyse de Barrington (Barrington & Finer 2007), onze essais randomisés sont classés selon trois utilisations :

- Traitement dès les trois premiers jours de vie devant une détresse respiratoire sévère,
- Traitement après trois jours de vie d'enfants à risque de DBP,
- Traitement de routine des nouveau-nés intubés, débuté avant trois jours de vie.

Ce dernier groupe, regroupant les travaux de Schreiber (Schreiber et al. 2003) et Kinsella (Kinsella, Cutter, et al. 2006a) est le seul où l'inhalation de iNO améliore le devenir : diminution de la mortalité et du critère composite associant DBP ou décès.

La méta-analyse de Askie (Askie et al. 2010) regroupe 14 essais randomisés soit 3430 prématurés. Le iNO n'a pas d'effet sur la mortalité ou la survenue de DBP. Seul le sous-groupe des prématurés ayant reçu une corticothérapie anténatale et du iNO en traitement d'attaque à 20ppm à partir de la deuxième semaine de vie semble trouver un bénéfice à l'inhalation de NO. Ce sous-groupe est essentiellement représenté par l'étude de Ballard (Ballard et al. 2006), où 582 prématurés de moins de 32 SA reçoivent du iNO à partir de la deuxième semaine de vie. L'inhalation débute à 20ppm avec une décroissance régulière et s'accompagne d'une diminution de sept points de pourcentage du taux de DBP à 36SA.

Au total, le iNO n'a pas fait la preuve de son efficacité dans la prévention de la DBP et n'est pas recommandé. Il est possible :

- qu'il n'ait tout simplement pas d'effet chez l'humain, en dépit des preuves expérimentales solides ;
- que l'on n'ait pas identifié le bon sous-groupe de prématurés qui pourrait en bénéficier (Mercier et al. 2009; Baud et al. 2009) ;
- que la voie de signalisation du iNO soit la bonne cible, mais que le NO comme médicament soit un choix discutable, vu ses effets divers et ambivalents. D'autres traitements pourraient stimuler cette voie comme l'éthylnitrite ou les inhibiteurs de phosphodiesterase comme le sildénafil.

Dans les deux derniers cas, le choix du "moment" du traitement, la dose et le contexte redox cellulaire sont déterminants.

1.2 POSSIBILITE D'UN EFFET A DISTANCE SUR LE CERVEAU

1.2.1 EXISTENCE D'UN METABOLISME ENDOVASCULAIRE

Le NO présente une très forte affinité pour l'hème de l'hémoglobine. Dans la circulation sanguine, le NO se fixe rapidement à l'oxyhémoglobine, induisant la formation de méthémoglobine (oxydation du fer ferreux Fe^{2+} en fer ferrique Fe^{3+}) et de nitrate (NO_3^-). Longtemps ces deux composés ont été perçus comme des voies terminales du catabolisme du NO, à sens-unique et sans activité biologique. De fait on prête une demi-vie très courte au NO dans la circulation sanguine, et des effets purement topiques par voie inhalé.

Pourtant l'inhalation de NO en clinique s'accompagne de phénomènes à distance : diminution des résistances vasculaires systémiques et hypotension à forte dose (80ppm), augmentation du débit de filtration glomérulaire et de la diurèse horaire (S. S. Miller & Rhine 2008). On a également démontré la fixation du NO à l'albumine, formant la S-nitroso-albumine (Stamler, Singel, et al. 1992b), puis d'autres protéines plasmatiques. Stamler démontre en 1992 que ces protéines S-nitrosylées exercent des effets analogues à ceux de l'EDRF sur le muscle lisse vasculaire ou l'agrégation plaquettaire (Stamler, Jaraki, et al. 1992a).

C'est surtout le champ de recherche de la vasodilatation hypoxique qui a illustré une propriété physiologique du transport endovasculaire du monoxyde d'azote. La vasodilatation hypoxique est un mécanisme rapide et local d'augmentation du débit sanguin pour répondre aux besoins métaboliques d'un tissu. Ce mécanisme d'autorégulation maintient l'adéquation apports/besoins pour une augmentation d'activité modérée et locale (par exemple mise en fonction d'une région cérébrale) sans adaptation systémique (modification de la pression artérielle ou du débit cardiaque) ou endocrinienne (Allen et al. 2009). Les acteurs biologiques de la vasodilatation hypoxique sont longtemps restés inconnus. Ce système nécessite un capteur, capable de mesurer la concentration en oxygène, un intégrateur qui déclenche une action en fonction du signal et un effecteur capable de modifier le diamètre du vaisseau. L'hémoglobine change de conformation en fonction de la pression partielle en oxygène, et peut constituer ce capteur. Le monoxyde d'azote, nous l'avons déjà vu, induit une vasodilatation par relaxation de la fibre musculaire lisse. Le chaînon manquant, l'intégrateur, est également incarné par l'hémoglobine. Voie alternative à la formation de méthémoglobine, le NO peut se lier au fer de l'hème sous forme de Fer-nitrosyl-hémoglobine ($Hb-Fe-NO$). Une fois lié à l'hème, le radical NO peut être déplacé sur une cystéine de la chaîne β , formant la S-nitroso-hémoglobine. D'autre part l'hémoglobine peut exercer l'activité de nitrite réductase et produire du NO à partir de nitrite circulant. Le poids respectif de ces deux voies biochimiques en physiologie et en pathologie est encore controversé.

1.2.1.1 Hypothèse hémoglobine-nitrosothiols

L'hémoglobine fonctionnerait comme le réservoir et le vecteur des effets du NO. Le NO se lie rapidement à l'hème de l'hémoglobine pour former soit la méthémoglobine soit la Hb-Fe-NO. Dans ce dernier cas, quand l'hémoglobine est en conformation R (oxyhémoglobine, dans l'artériole), Le NO est déplacé de l'hème vers une cystéine de la chaîne β (Cys β 93) formant la S-nitrosyl-hémoglobine (Stamler et al. 1997). En milieu capillaire le relargage d'oxygène modifie la conformation de l'hémoglobine (forme T). Le radical NO est alors soit déplacé vers l'hème, soit transféré sur des radicaux thiols par des réactions de S-transnitrosylation.

La protéine transmembranaire AE1 (anion exchanger 1) serait le deuxième maillon de la chaîne après l'hémoglobine et responsable de la sortie du "groupement NO" de l'érythrocyte (Gross 2001; Pawloski & Stamler 2002). Il se lie à des molécules de petit poids moléculaire, les S-nitrosothiols (par exemple S-nitrosocystéine, S nitrosoglutathion), de formule R-SH. Ces molécules ont des propriétés biologiques qui reproduisent celles du NO (McMahon et al. 2000) et surtout une demi-vie plus longue que le NO dans le plasma. Ces réactions de transnitrosylation en cascade protégeraient le radical NO d'une recapture immédiate par l'hémoglobine en intravasculaire ou la myoglobine dans le cytoplasme. L'effet biologique pourrait être entièrement supporté par ces protéines S-nitrosylées, ou bien par un relargage de NO à partir de ces S-nitrosothiols, par une réductase à proximité de la cible.

Plus récemment, certains auteurs envisagent la S-nitrosylation comme modification post-transcriptionnelle des protéines, avec des effets possiblement comparables à la phosphorylation des protéines (Gow et al. 2004).

1.2.1.2 Hypothèse nitrite / nitrite réductase

La S-nitroso-hémoglobine n'est pas indispensable à la vasodilatation hypoxique, démonstration faite par mutagenèse dirigée sur la cystéine 93 de la chaîne β de l'hémoglobine (Isbell et al. 2008).

L'hypothèse alternative est la réduction du nitrite en NO par une nitrite-réductase. A partir de 1994, on décrit la synthèse de NO à partir de Nitrites dans l'estomac (Benjamin et al. 1994; Lundberg et al. 1994), puis dans le myocarde ischémique (Zweier et al. 1995). La réduction des nitrites (et nitrate NO₂-) en NO est catalysée par la deoxyhémoglobine, la myoglobine, la xanthine oxydoréductase, l'acide ascorbique, les polyphénols, les protons. Cette activité de nitrite réductase est plus efficiente à basse pression partielle d'oxygène, c'est à dire en situation hypoxique (Nagababu et al. 2003; Cosby et al. 2003; Gow et al. 2004). L'activité "nitrite-réductase" de l'hémoglobine varie selon sa conformation allostérique (R ou T state)(Gladwin et al. 2005). L'activité enzymatique maximum s'exerce pour 50% de saturation de l'hémoglobine par

l'oxygène (Huang 2005). In vivo un gradient artérioveineux de concentration de nitrate existe, suggérant une consommation capillaire (Gladwin et al. 2000).

L'injection de nitrite chez le rat corrige les effets du blocage pharmacologique des NOS : correction de la pression artérielle moyenne et du débit sanguin cérébral (mesurés respectivement par cathéter et par doppler)(RIFKIND et al. 2007). En 1978 Mittal constate que l'injection de doses millimolaires de nitrite active la guanylate cyclase soluble (Mittal et al. 1978). L'injection de nitrite à dose millimolaire toujours s'accompagne d'hypotension artérielle chez l'homme (Cosby et al. 2003). Ce qui corrobore l'effet observé à l'injection de nitrite à haute dose comme antidote de l'empoisonnement au cyanure : une hypotension est souvent constatée chez ces patients. L'injection de nitrite n'induit de vasodilatation qu'injecté à une concentration finale supérieure à 300 μ mol/L (Gladwin 2008). En physiologie vasculaire, des doses micromolaires de nitrite suffiraient in vivo à induire une vasodilatation dans les territoires hypoxiques. C'est ce que suggère la publication de Maher en 2008 (Maher et al. 2008).

Il est indiscutable que les deux mécanismes existent in vivo, mais la controverse reste vive sur leur implication respective en physiologie et en pathologie. En particulier, le rôle des nitrites est régulièrement renvoyé à un processus pathologique uniquement, en situation hypoxique, au profit de la voie des S-nitrosothiols en physiologie (Stamler et al. 2012).

En résumé, si le métabolisme endovasculaire réversible du NO ne fait pas de doute, restent plusieurs énigmes à résoudre :

- Qui joue le rôle de réservoir endovasculaire du NO : S-nitrosothiols, nitrites ou les deux ?
- Les protéines S-nitrosylées rendent-elles comptent des propriétés biologiques du NO ou libèrent-elles in fine du NO via une réductase ?
- Dans le cas où le NO serait formé par l'activité de nitrate réductase de l'hémoglobine, comment peut-il traverser la membrane du globule rouge, l'espace plasmatique, et atteindre une sGC intracellulaire, connaissant sa grande réactivité, sans se lier aux nombreux hèmes et thiols environnants (Allen et al. 2009)?

1.2.2 CERVEAU EN DEVELOPPEMENT

Le développement cérébral débute avec l'individualisation d'un tissu : c'est l'induction neuroectodermique, sous la gouverne de gradients protéiques (troisième semaine de grossesse). Le tissu évolue en organe, avec mise en place des contingents cellulaires. Prolifération et migration neuronale, mort cellulaire programmée, gliogénèse, prennent place durant le deuxième trimestre de grossesse et s'étendent au delà du terme pour les deux derniers. Enfin, la période de maturation : la myélinisation débute peu avant le terme jusqu'à deux ans environ, la synaptogénèse commence dès 20 SA et se poursuit la vie durant (Martin et al. 2010).

Autrement dit, lorsque survient une naissance prématurée (entre 23 Semaines d'Aménorrhée, SA, et le terme) sont schématiquement concernées :

- La fin de la prolifération neuronale et de la migration neuronale,
- La gliogénèse,
- La synaptogénèse,
- La myélinisation.

1.2.2.1 Développement cérébral

1.2.2.1.1 Neurulation

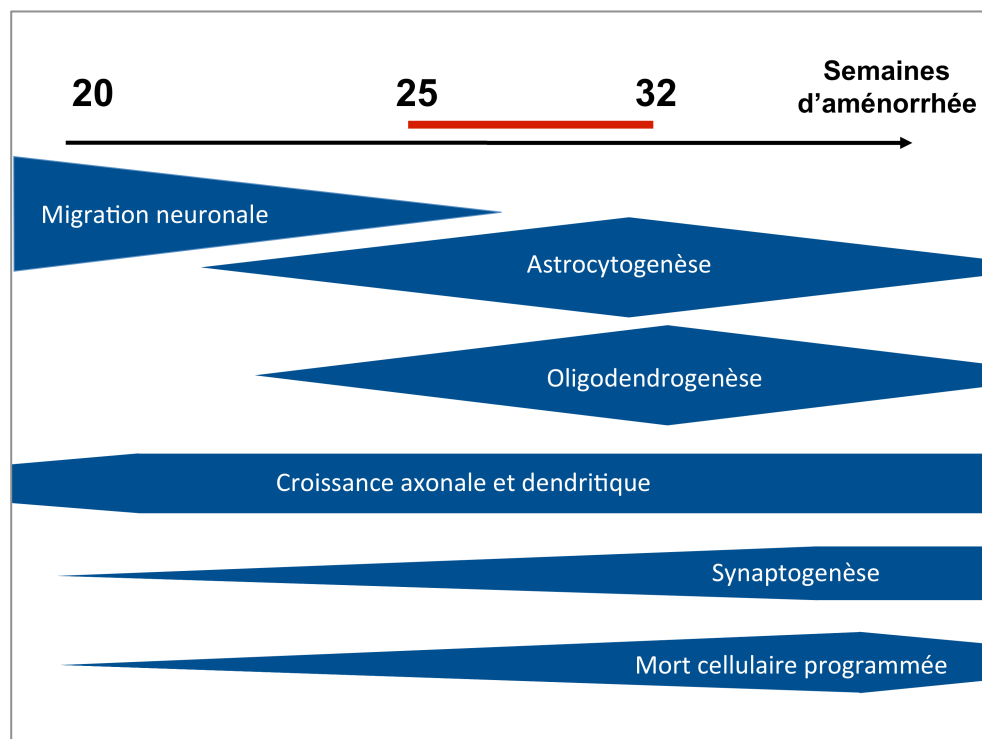
Au début de la troisième semaine de gestation, sous l'impulsion de signaux provenant de cellules mésodermiques (notochorde et mésoderme préchordal), la partie médiale de l'ectoderme s'épaissit en plaque neurale. C'est l'induction neurale. Les cellules neurales prolifèrent, deviennent moins hautes et plus larges, et s'accumulent sur les bords de la plaque neurale. Celle-ci s'invagine en gouttière neurale puis tube neural par fusion de ses deux bords, depuis le centre du tube vers ses extrémités. Les cellules neuroectodermiques les plus dorsales, au point de fusion, se différencient en crêtes neurales. Le tube neural s'invagine dans l'ectoderme, jusqu'à ce que ce dernier se referme au dessus du tube et l'isole du milieu extérieur. On observe rapidement une polarisation rostrocaudale de la plaque neurale, puis une polarisation dorsoventrale du tube neural.

Cette organisation repose sur la superposition de gradients protéiques dessinant des « coordonnées cartésiennes » au sein du tissu. Les homéogènes ou morphogènes sont à l'origine de ces gradients. Ainsi, l'induction de la plaque neurale est induite par Fibroblast Growth Factor (FGF), ou inhibée par TGF β (Transforming Growth Factor β) et Wnt (Wingless/Wingless-related MMTV integration site)(Hoch et al. 2009). L'axe rostro-caudal, sur lequel on distingue le prosencéphalon, le mésencéphalon, le rhombencéphalon, les rhombomères, est segmenté par les gènes de la famille HOX (clustered homeobox-containing

genes), FGF8 (fibroblast growth factor 8), Krox20, Wnt1 et 2, En-2 (engrailed gene), les familles OTX et EMX, les morphogènes FGF et Retinoïc Acid. Quant à BMP, la famille PAX, SHH (Bone morphogenetic factor, Paired box genes, et sonic hedgehog, respectivement), ils segmentent des régions dans le plan dorso-ventral.

En fonction de leur concentration et de leur combinaison, ces facteurs de transcription auront une action activatrice ou inhibitrice sur des régions du génome à même d'orienter la différenciation cellulaire. Ces homéogènes sont très conservés à travers les vertébrés, et en nombre restreint. Ce sont leur combinatoire et leur activité selon des gradients et dans le temps, qui autorisent des niveaux d'organisation plus ou moins complexes en fonction des espèces. Pour davantage de détails, les références suivantes sont suggérées (Koentges 2008; Lagercrantz et al. 2010; Koentges 2008; Copp et al. 2003). Jusqu'à 8 semaines de gestation environ les principales subdivisions du système nerveux central sont mises en place.

Figure 1.7 : Séquence du développement cérébral humain



1.2.2.1.2 Mise en place des contingents cellulaires et migration.

Chez les vertébrés, la majeure partie du contingent neuronal est mise en place avant le contingent glial. Ce sont les mêmes cellules souches multipotentes, situées en zone germinale périventriculaire qui donnent les différents types cellulaires du système nerveux (Merkle & Alvarez-Buylla 2006). Autrement dit, entre 10 et 25 SA chez l'humain, ces cellules génèrent 10 à 100 millions de

neurones, puis à partir de 20 SA et durant plusieurs années, probablement dix fois plus de cellules gliales. Les régulations de cette production et de sa commutation sont sous la dépendance de facteurs de transcription, d'informations épigénétiques, et de l'environnement cellulaire (F. D. Miller & Gauthier 2007). Ainsi, Notch bloque la différenciation cellulaire, comme certains gènes de la famille Sox : sox1, sox2, sox3. La différenciation en progéniteur neuronal est promue par Sox 21, neurogénine (ngn1), la signalisation mek/erk, smad, p300 et des inhibiteurs de l'astrogénèse comme Ncor et mecp2 (Wegner & Stolt 2005; F. D. Miller & Gauthier 2007). La commutation d'une production de neurones vers une production de cellules gliales dépend de la voie JAK-STAT, activée par des récepteurs de cytokines comme gp130 et LIR β . Un de leurs ligands est la cardiotrophin 1. Une autre voie est constituée du récepteur MBP, en relation avec STAT, le coactivateur p300, et Smad (F. D. Miller & Gauthier 2007). Par ailleurs sox9 promeut la différenciation en cellule gliale, tout comme pax6 (Götz et al. 1998). Sox10 est associé à la maturation oligodendrocytaire (Wegner & Stolt 2005).

Le nombre de cellules augmentant, l'organisation unistratifiée évolue en parenchyme multistratifié. Les cellules souches sont confinées autour du système ventriculaire, quand les cellules filles se placent à la zone piale, périphérique, et forment la zone plexiforme primitive.

La migration neuronale est associée à une différenciation des progéniteurs en neurones et à une sortie du cycle de réplication. Les neurones en migration sont post-mitotiques ou G0. Dans la description classique selon Rakic, les neurones migrent de façon radiaire selon des guides gliaux, depuis les zones germinatives périventriculaires (Rakic & Lombroso 1998). Une protocarte au sein de la zone germinative participe à l'organisation du cortex en colonnes anatomo-fonctionnelles. Les glies radiaires projettent cette protocarte sur le cortex. Les glies radiaires sont organisées par fibrilles de 5 à 8, associées à un pool de neurones, formant une « unité fonctionnelle ». Les glies fournissent la direction de la migration mais probablement aussi l'énergie nécessaire à cette migration en région a-vasculaire.

Les circonstances de mise en place et la nature cellulaire de ces glies radiaires restent peu précises. Des progéniteurs neuronaux peuvent exprimer transitoirement GFAP, marqueur utilisé en immunohistochimie pour caractériser les astrocytes. Ces glies seraient davantage une population de progéniteurs pouvant distribuer des astrocytes mais aussi des neurones (Fricker-Gates 2006).

Depuis l'hypothèse classique de Rakic, on a décrit d'autres trajets de migration neuronale, en particulier pour les interneurones GABA à destination des couches corticales supérieures. Dans le cerveau des primates, ces neurones migrent du télencéphalon ventral jusqu'au télencéphalon dorsal, puis tangentiellement dans la zone intermédiaire. Secondairement, la migration est centrifuge, radiaire ou oblique, à destination des couches corticales supérieures

(entre 20 et 27 semaines de gestation)(Bystron et al. 2008; Kriegstein & Noctor 2004).

Chaque vague de migration traverse la précédente pour former une nouvelle couche corticale plus externe. Dès 10-12 semaines de grossesse sont formées la couche 1 et la sous-plaque. La sous-plaque tient un rôle essentiel dans l'organisation du néocortex, servant :

- De contact synaptique pour les fibres thalamocorticales ou corticocorticales afférentes avant la différenciation du cortex,
- De lien fonctionnel entre ces afférences et leur cible corticale,
- A fournir une guidance aux axones « éclaireurs » projetés par le cortex vers les cibles sous corticales.

Ces neurones produisent des axones pour la capsule interne, pour le corps calleux qui serviront respectivement de guide pour les axones corticospinaux (couches V et VI) et les axones thalamocorticaux (couche IV). L'épaisseur de la sous-plaque est maximale entre 22 et 36 semaines de gestation, elle disparaît ensuite par apoptose/fusion à la couche VI.

Le thalamus reçoit des neurones du diencephalon à partir de 12 semaines de grossesse puis des neurones GABA en provenance de la zone germinative ventrale pour les noyaux médiodorsal et pulvinar vers 23 SG. Les boucles thalamocorticales associatives impliquées dans les fonctions cognitives supérieures se développeraient entre 15 et 34 SG.

1.2.2.1.3 Quelques déterminants génétiques de la migration neuronale

Les molécules impliquées dans la migration et l'adressage des neurones peuvent être regroupées en plusieurs familles :

- Molécules du cytosquelette, notamment Filamine A, Arfgef2, DCX et LIS1 (dont les mutations chez l'humain sont associées à différentes formes de lissencéphalie) ;
- Molécules de signalisation : des glycoprotéines comme la Reeline, des récepteurs à la Reeline, le récepteur 2 à l'ApoE (Apoer2) ;
- Modulateurs de glycosylation (POMT1, POMGnT1, Fukutine, associés respectivement aux syndrome de Walker-Warburg, Muscle-eye-brain, et dystrophie musculaire de Fukuyama, tous syndromes où l'on retrouve une lissencéphalie de type II-cobblestone) ;
- Autres facteurs : la neurotransmission est un acteur important puisque le GABA stimule la migration neuronale, à l'inverse, des inhibiteurs spécifiques du NMDA bloquent la migration neuronale (Komuro & Rakic 1993). Des facteurs neurotrophiques (neurotrophine 4, BDNF),

des molécules du métabolisme peroxysomal sont également impliqués, ainsi que les hormones thyroïdiennes.

La migration d'un neurone se fait par saut de puce, et commence par la projection d'un diverticule cytoplasmique, le centrosome se déplace ensuite dans ce processus « axonal », enfin rejoint par le nucléus. La filamine A participe à la réorganisation du cytosquelette à l'origine de ce déplacement. Les protéines comme la reeline, les neurotrophines, participent à transmettre au cytosquelette les signaux de l'environnement cellulaire. Des neurotransmetteurs ou des facteurs neurotrophiques comme les hormones thyroïdiennes inhibent ou stimulent la migration cellulaire. Le transcriptome de chaque type de neurone définit la réponse à ces interactions et in fine la destination de la cellule.

1.2.2.1.4 Croissance axonale et dendritique, synaptogénèse.

Après la neurulation et la migration neuronale, la synaptogénèse est le troisième acte majeur du développement cérébral. Elle est naturellement associée aux processus de croissance axonale et dendritique. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la croissance et la guidance axonale ressemblent à ceux de la migration neuronale : le transcriptome de chaque neurone détermine les connexions que le neurone peut établir, et la réponse aux chémoattracteurs ou répulsifs de l'environnement. En réponse à ces molécules de l'environnement (nétrine, sémaphorine, cadhérine, éphrine, glycoprotéines de la matrice extracellulaire) la concentration de calcium au cône neuronal est modifiée et des projections axonales ou cytoplasmiques sont émises. A un stade précoce de développement les petites distances facilitent l'adressage d'axones « pionniers » qui serviront de guide aux projections ultérieures

Cinq phases sont décrites dans la synaptogénèse :

- Phase 1, de 7 à 15 semaines de gestation, concerne un faible nombre de synapses établies en zone intermédiaire ;
- Phase 2, de 12 à 36 semaines de gestation, formation de synapses dans la plaque corticale ;
- Phase 3, de la moitié du troisième trimestre de grossesse à 8 mois de vie, appelée « synaptic big bang » en raison du nombre de synapses créées (de l'ordre de centaines de millions par seconde chez l'humain). La densité maximum de synapse est atteinte à ce stade ;
- Phase 4, jusqu'à la puberté, dite phase de plateau ;
- Après une diminution marquée du nombre de synapses durant la puberté, la Phase 5 se poursuit jusqu'au décès, avec une synaptogénèse peu abondante et une diminution lente de la densité synaptique.

Les phases 3, 4 et 5 sont influencées par l'environnement et l'expérience. Par ailleurs la survenue n'est pas uniforme dans le cortex et dépend de/conditionne la maturation des différentes aires corticales. Ces processus sont initiés d'abord dans les zones motrices, sensorielles, primaires et sont plus tardives en zone associative et en cortex frontal.

Les projections axonales, dendritiques, et les synapses, sont produites en excès, de façon labile et redondante, et secondairement sélectionnées et stabilisées. Cette sélection dépend de facteurs génétiques et de l'environnement, de l'expérience. Les redondances axonales sont éliminées selon la survie/apoptose du neurone, compétition pour les facteurs trophiques, et par la stimulation, c'est à dire l'activité électrique. Il existerait deux types de connexion : celles soumises à un rétrocontrôle et à la sélection/élimination, et des connexions intercorticales déterminées génétiquement et moins influencées par l'environnement.

Les synapses sont sélectionnées par stabilisation : parmi toutes les synapses produites de façon redondante et labile, les synapses pertinentes sont celles qui sont utilisées.

1.2.2.1.5 Mort cellulaire programmée :

Les neurones sont également produits en excès et sélectionnés. Quinze à 50% des neurones sont éliminés, dont les deux tiers entre 28 et 41 semaines de gestation.

La survie neuronale dépend de l'intégration de signaux de mort, de la balance de facteurs trophiques, d'effecteurs et d'inhibiteurs de mort et de survie, de l'activité électrique du neurone. Selon la sommation de ces signaux, un processus de mort cellulaire programmée peut être initié.

Une voie d'apoptose dépend des caspases, elle peut être activée par mécanisme intrinsèque (via la mitochondrie, le cytochrome C, la famille bcl2) ou par voie extrinsèque (récepteurs au TNF).

Dans la voie d'apoptose indépendante des caspases, aif (apoptosis inducing factor) est relargué par la mitochondrie.

Des bloqueurs des récepteurs NMDA (mk801, kétamine), des agonistes GABA (phénytoïne, phénobarbital, benzodiazépines, vigabatrin, valproate), certains anesthésiques (isoflurane, nitrous oxide), l'éthanol, les sulfites, la dexaméthasone favorisent ou déclenchent l'apoptose neuronale (Degos et al. 2008).

1.2.2.1.6 Mise en place des astrocytes

Les astrocytes du néocortex ont deux origines. Certains proviennent des glies radiaires, par migration depuis la zone intermédiaire. D'autres proviennent de

la zone germinative où prolifèrent des progéniteurs astrocytaires (cf. plus haut). Les cellules filles migrent secondairement dans le cortex le plus superficiel, dès 24 semaines de gestation, avec un pic à 26-28 semaines de gestation. Les astrocytes ont de nombreux rôles dans le développement cérébral. Ils participent à la guidance axonale à la croissance et à la survie neuronale en produisant de nombreux signaux de l'environnement cellulaire : facteurs neurotrophiques, matrice extracellulaire, facteurs de survie neuronale. Comme dans le cerveau mature, les astrocytes approvisionnent le métabolisme neuronal par production de lactate, régulent l'osmolarité intercellulaire. Les astrocytes captent le glutamate extracellulaire, ce qui peut être mis à profit en situation d'excito-toxicité.

1.2.2.1.7 Maturation des oligodendrocytes / myélinisation.

Les progéniteurs des oligodendrocytes (marquage NG2+) sont émis par les zones germinatives périventriculaires durant les derniers mois de grossesse et premiers mois de vie. Durant leur migration en substance blanche, ils mûrissent en pré-oligodendrocytes (marquage O4+, O1-) et possèdent une capacité de réplication. C'est le stade maturatif dominant en fin de grossesse en substance blanche périventriculaire. Vers la naissance et durant les premiers mois de vie, ces pré-oligodendrocytes mûrissent en oligodendrocytes immatures (marqueurs O4+ O1-). Ce sont des cellules multipolaires, qui commencent à émettre des prolongements cytoplasmiques péri-axonaux. Enfin les oligodendrocytes deviennent matures, des cellules très ramifiées, productrices de myéline (marqueurs O4+; O1+; MBP+; PLP+). Cette maturation oligodendrocytaire dépend de nombreux facteurs et hormones : basic FGF, neurotrophin 3, PDGF, IGF1, IL6, hormones thyroïdiennes.

La myélinisation est associée à la maturation fonctionnelle des aires corticales, même si un décalage existe entre la myélinisation « à l'imagerie » d'une région cérébrale et son fonctionnement. La myélinisation débute par les voies optiques, olfactives, acoustiques et les aires corticales correspondantes (cortex sensoriel primaire) puis se poursuit par les voies motrices (bras postérieur de la capsule interne). Elle se termine par le cortex associatif à l'âge adulte.

Comme pour les neurones, les oligodendrocytes sont produits en large excès et 50% environ seront éliminés par apoptose.

Nous verrons plus loin que les préoligodendrocytes sont très vulnérables aux agressions inflammatoires, oxydatives, ischémiques, rencontrées en période périnatale. La maturation de la lignée oligodendrocytaire est durablement compromise dans les lésions de substance blanche du prématuré et rendrait en partie compte du retard de myélinisation qu'on y observe (Volpe 2011).

1.2.2.1.8 Microglie et macrophages cérébraux

Les microglies comptent pour 5 à 15% des cellules cérébrales. Ce type cellulaire n'est pas produit par les cellules souches en zone germinative. Ces cellules proviennent de la moelle osseuse améboïde, expriment les caractéristiques antigéniques des macrophages. En évoluant vers une forme mature et quiescente, le corps cellulaire devient plus petit et les prolongements cytoplasmiques plus longs. Leur rôle dans le développement est mal précisé. Elles interviennent probablement dans la phagocytose des produits d'apoptose. Dans le cerveau mature elles interviendraient dans la régulation du milieu extracellulaire et la protection immunitaire. En pathologie périnatale leur rôle est plus connu, elles sont le relais et la source d'agressions en relargant notamment des cytokines et des radicaux libres.

1.2.2.1.9 Développement vasculaire

Anatomiquement, on décrit 3 stades au développement vasculaire cérébral :

- Au stade préchoroïdal I, la plaque neurale puis le tube neural sont alimentés par diffusion du liquide amniotique. Il s'agit d'une perfusion extra-embryonnaire.

- Au stade préchoroïdal II, le manteau neural s'est épaissi, un plexus vasculaire se développe à sa surface. La vascularisation est extrinsèque, extraneurale, et fait partie d'une méninge primitive. En profondeur le plexus vasculaire s'organise grossièrement en capillaires primitifs. En surface, des vaisseaux de plus gros calibre se forment par fusion de capillaires de ce plexus. Les premières artères et veines cérébrales sont formées. Elles vont s'aboucher aux gros vaisseaux qui colonisent ces tissus, en provenance de l'aire cardiaque.

- Enfin ces plexus vasculaires denses s'invaginent vers la cavité centrale du tube neural. De cette manière sont formés les plexus choroïdes. Nous sommes à la fin de la période embryonnaire, c'est le stade choroïdal, une vascularisation intrinsèque est en place.

A cette période – vers la 11^e semaine de gestation - les carotides internes primitives vascularisent ces plexus. Elles délivrent toute la vascularisation du prosencéphale et du rhombencéphale, y compris via les cérébrales postérieures qui ne se raccorderont que plus tard aux artères vertébrales. Les branches artérielles prédominantes sont alors les artères quadrigéminales et choroïdales. A cet âge, le drainage veineux profond est médian et unique, via la veine médiane prosenchéphalique dite de Warkowski (plus tard cette veine médiane involue en partie, il n'en subsiste que l'extrémité distale - la veine de Galien).

Les déterminants cellulaires et moléculaires de ce développement vasculaire seront détaillés en deuxième partie, en particulier l'intrication de l'angiogenèse et de la mise en place des contingents cellulaires neuronaux.

1.2.2.2 Vulnérabilité du cerveau en développement : encéphalopathie du prématuré.

La leucomalacie périventriculaire est une des complications majeures de la prématurité (Hagberg & C. Mallard 2005). Son phénotype s'est modifié avec l'évolution de la prise en charge des prématurés : à la leucomalacie périventriculaire kystique et focale s'est substituée une forme diffuse. Ces lésions cérébrales résultent de la conjugaison :

- D'une fenêtre de susceptibilité du cerveau en développement, en particulier de la lignée oligodendrocytaire (Deng et al. 2008) ;
- Et des agressions subies par le prématuré : inflammation, stress oxydatif, hypoxo/ischémie, carence en facteurs de croissance (Baud, Daire, et al. 2004a)...

La pathophysiologie inclut une activation microgliale, une inflammation parenchymateuse, et une apoptose/nécrose de pré-oligodendrocytes. A cette amputation du pool d'oligodendrocyte répond une prolifération de progéniteurs oligodendrocytaires. Mais ces derniers semblent incapables de poursuivre le programme de maturation habituel et demeurent au stade de progéniteurs – non myélinisants. Sur le versant neuronal, on retrouve une perturbation de l'organisation corticale, et des lésions axonales (Volpe 2001). Chez l'humain la période de vulnérabilité maximum se situe entre 23 et 34 semaines d'aménorrhée. La dénomination "d'encéphalopathie du prématuré" a été récemment proposée par Volpe plutôt que "leucomalacie périventriculaire" pour rendre compte du caractère diffus des lésions.

1.2.2.2.1 Description histologique de la leucomalacie périventriculaire

La forme kystique ou focale, première décrite, consiste en une nécrose de tous les éléments cellulaires, en substance blanche profonde, périventriculaire. Cette nécrose peut évoluer en quelques semaines vers des lésions kystiques facilement visualisables à l'échographie transfontanellaire. On a plus récemment prouvé que des lésions diffuses sont associées aux lésions focales. Elle n'est plus représentée que chez moins de 5% des enfants de très petit poids de naissance (Woodward et al. 2006).

Virchow en a décrit les premières lésions histologiques en 1873 et suggère le lien avec une infection puisqu'une chorioamniotite est régulièrement identifiée chez les mères de ces enfants. Parot la même année évoque une susceptibilité particulière du cerveau prématuré, puis Rydberg développe une hypothèse hémodynamique. Banker et Laroche en 1962 complètent la description histologique de cette leucomalacie focale (Martin et al. 2010).

Au sein de la substance blanche périventriculaire, on observe en microscopie une perte de cytoarchitecture et une vacuolisation du cytoplasme dans les

premières heures post agression. Dans les 3 jours suivants sont observés œdème axonal et activation microgliale diffuse. En périphérie : hyperplasie astrocytaire et de l'endothélium vasculaire. Après 1 à 2 semaines : activité macrophagique, cavitation du tissu et formation de kystes. Aux stades subaigu et chronique, les axones accumulent du calcium, du fer et dégénèrent.

Depuis cette caractérisation ancienne des lésions, on a décrit une atteinte plus diffuse et plus étendue de la substance blanche impliquant une prolifération astrocytaire, une activation microgliale et une perte neuronale, spécialement dans les couches profondes corticales, l'hippocampe et les cellules cérébelleuses de Purkinje.

A cette histologie correspond l'évolution classique vers les séquelles motrices, classiquement diplégie spastique décrite par Little ou plus largement infirmité motrice cérébrale ou « cerebral palsy » des anglo-saxons.

On décrit également des atteintes sous forme de nécroses focales millimétriques non visibles à l'ETF et qui ne donnent pas de kystes mais une cicatrice fibreuse : c'est une leucomalacie focale de forme non kystique

A ce tableau classique s'est substitué une leucomalacie diffuse, avec la survie de prématurés plus immatures et la meilleure maîtrise d'agressions aiguës de type anoxoischémique. Cette nouvelle forme représente 90% des leucomalacies. Sa prévalence est d'environ 20% chez les prématurissimes, et pourrait toucher selon des séries histologiques 50% de ces enfants (Inder et al. 2005). Le tableau clinique s'est également modifié, les études de cohortes objectivent une émergence nette des atteintes cognitives et comportementales. L'incidence des séquelles motrices semble stable mais concerne avant tout les prématurés en deçà de 26 SA (Larroque et al. 2008; Volpe 2005; Back 2006).

Macroscopiquement, cette forme diffuse se présente comme une perte de substance blanche souvent associée à une ventriculomégalie, un corps calleux aminci, un retard de myélinisation. Ces items sont retrouvés à l'imagerie par résonnance magnétique et dans une moindre mesure à l'échographie transfontanellaire (cf. infra).

Microscopiquement les principaux marqueurs sont (Leviton & Gilles 1996):

- Mort de pré-oligodendrocytes, suivie d'une prolifération de progéniteurs ;
- Activation microgliale diffuse ;
- Prolifération astrocytaire, à l'origine d'une cicatrice gliale ;
- Dégénérescence axonale et perte neuronale.

Ces événements cellulaires ont des répercussions sur la migration neuronale, la croissance axonale et la synaptogénèse, la maturation oligodendrocytaire. A la phase aigue de l'agression, il y a augmentation de l'apoptose des pré-

oligodendrocytes. On constate alors une réplication rapide des progéniteurs oligodendrocytaires, et la reconstitution d'un pool de pré-oligodendrocytes quantitativement normal. Mais ces derniers semblent incapables de se différencier en oligodendrocytes myélinisants. Ce blocage maturatif proviendrait :

- D'une inhibition de la différenciation ? Le récepteur TLR2 à la surface des préoligodendrocytes est impliqué dans cette différenciation.
- D'une persistance de l'agression sur les pré-oligodendrocytes ? Chez l'humain la physiopathologie des lésions de substance blanche, faite d'agression répétées et séquentielles, appuie cette hypothèse (Volpe 2011).

Récemment l'équipe de Black (Buser 2012) a comparé les examens anatomopathologiques et immunohistochimiques de deux cohortes de prématurés. La densité d'oligodendrocytes totaux augmente dans la région malacique aux dépens des formes plus matures d'oligodendrocytes. Ces résultats plaident en faveur d'un blocage maturatif de la lignée oligodendrocytaire chez l'homme.

Concernant les lésions neuronales, l'atteinte précoce des axones est révélée par les marquages du précurseur β -amyloïde ou la fractine. Dans les jours suivants apparaissent des marqueurs classiques de nécrose : calcification, accumulation de Fer, dégénérescence. Les faisceaux axonaux déjà en place sont interrompus (Haynes et al. 2008).

Cette perte axonale s'accompagne de la diminution de densité et d'organisation des neurones du cortex et du thalamus. Parmi les hypothèses à cette désorganisation neuronale, on compte (Huppi 2002) :

- La mort neuronale en conséquence de la lésion axonale ;
- La perte de progéniteurs en zone germinative périventriculaire ;
- Les atteintes de la sous-plaque, dont on connaît le rôle critique dans l'organisation corticale.

Chez les enfants présentant une leucomalacie périventriculaire, on démontre une apoptose plus intense dans la sous-plaque (marquage caspase 3) comparativement aux enfants indemnes (Volpe 1996; Leviton & Gilles 1996; McQuillen et al. 2003; Robinson et al. 2006).

Le thalamus est également concerné : Son volume est diminué chez les enfants ex-prématurés, lorsqu'on leur réalise une IRM au terme ou dans l'enfance. A l'étude histologique de 41 cerveaux de prématurés, il est rapporté une perte neuronale et une gliose au sein du thalamus pour 40 et 60% des enfants présentant une leucomalacie, respectivement (Ligam et al. 2009; Pierson et al. 2007). Difficile à l'heure actuelle de préciser s'il s'agit de lésions primitives, ou secondaires par perte de l'effet trophique axonal.

1.2.2.2.2 Imagerie

L'échographie occupe une grande place dans le dépistage des lésions cérébrales du prématuré. Efficace pour dépister les processus hémorragiques, ainsi que les lésions de leucomalacie kystique, elle est moins sensible et spécifique pour identifier des lésions diffuses de substance blanche. La classification de Sie (Sie et al. 2000) s'appliquent mieux aux leucomalacies focales qu'aux diffuses.

A la phase précoce, l'œdème inflammatoire en substance blanche est identifié par une hyperéchogénicité marquée (tonalité équivalente aux plexus voisins), éventuellement asymétrique, et persistant plus de 10 jours (de Vries et al. 2011).

A la phase tardive, on repère facilement les kystes des formes dites kystiques focales. Les formes diffuses sont suspectées devant un corps calleux mince, une ventriculomégalie *a vacuo*, une paroi ventriculaire festonnée, reflets d'une substance blanche atrophique.

L'imagerie par Résonance magnétique (IRM) contribue plus largement au diagnostic et à la caractérisation expérimentale des leucomalacies diffuses.

Au stade précoce, la substance blanche œdématiée apparaît hyperintense en T1, hypointense en T2. Plus sensible est l'altération de la diffusion (DWI, Diffusion weighted imaging ou DTI Diffusion tensor imaging) qui traduit la diminution de la diffusion de l'eau, due à l'œdème.

Tableau 1 : Classification des hyperéchogénicités cérébrales (Sie et al 2000)

Grade I	hyperéchogénicité < 7j, sans formation de kystes (a si homogène, b si inhomogène)
Grade II	Hyperéchogénicités évoluant vers la formation de petits kystes de faible nombre
Grade III	Idem avec kystes étendus
Grade IV	Hyperéchogénicité étendue à la région sous-corticale, kystes étendus (/porencéphalie)

Secondairement on peut retrouver à l'IRM les kystes de la forme focale kystique, les signes d'atrophie du corps calleux, de la substance blanche, la ventriculomégalie. La substance blanche est hyperintense en T2. Appelée DEHSI (Diffuse Excess High Signal Intensity), ce marqueur se retrouve chez 40 à 70%

des enfants de petit poids de naissance arrivés à terme. L'étude du bras postérieur de la capsule interne est importante pour préciser le pronostic moteur. Une diminution de l'anisotropie et une absence de myélinisation à terme sont corrélées à des séquelles motrices contralatérales (Inder et al. 2005; de Vries et al. 2011).

Les études volumétriques, en comparant les prématurés et des non prématurés à terme corrigé égal, ont montré :

- une diminution du volume de substance blanche ;
- une diminution de volume cortical (Inder et al. 2005; Inder et al. 1999), en particulier en cortex pariéto-occipital, mais aussi sensori-moteur, prémoteur, temporal, hippocampal (Peterson et al. 2000; Abernethy et al. 2004; Peterson et al. 2003) qui corrèle avec le type de sensoriel ou cognitif ;
- une diminution du volume des noyaux gris centraux (Lin et al. 2001; Inder et al. 2005).

Les études de tractographie, encore largement expérimentales, objectivent des désorganisations fréquentes du faisceau rétrolenticulaire de la capsule interne, de la corona radiata, des fibres commissurales du corps calleux et faisceaux thalamiques. L'autre intérêt de cette technique est d'objectiver la réorganisation des faisceaux autour de lésions, ce qui permet d'appréhender le potentiel de plasticité cérébrale.

En spectroscopie, les marqueurs de glycolyse anaérobie, le lactate, sont des marqueurs de souffrance aigue. Le N-acétylaspartate est un marqueur d'intégrité neuronale.

1.2.2.2.3 Pathophysiologie des lésions de substance blanche des prématurés

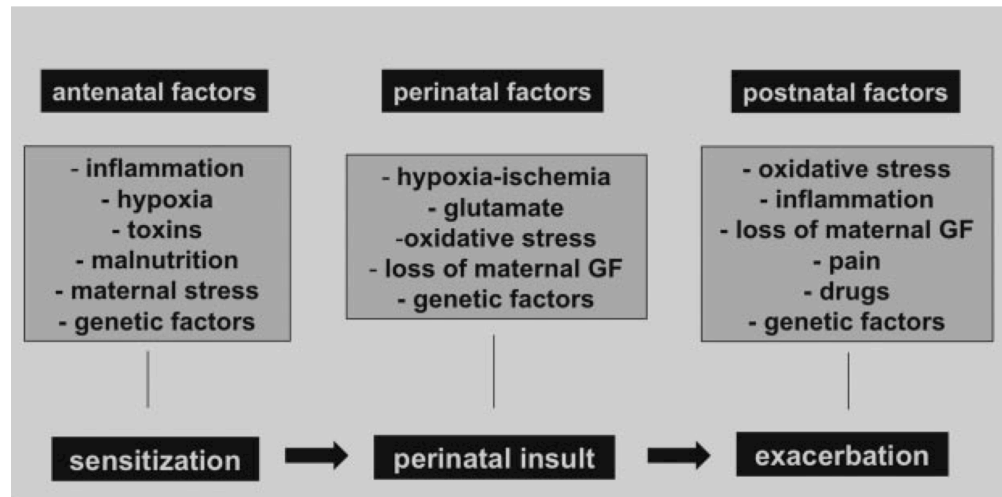
Notre compréhension de la physiopathologie de l'encéphalopathie du prématuré a énormément progressé avec l'utilisation de modèles animaux. La conception actuelle associe :

- Le cumul ou la séquence de plusieurs agressions, multifactorielles, anté, péri et/ou post natales,
- Et des vulnérabilités particulières du cerveau ; où les microglies sont déjà fonctionnelles et prêtes à sécréter des facteurs inflammatoires, où la lignée oligodendrocytaire est particulièrement vulnérable à l'excitotoxicité, au stress oxydatif et nitrosatif ; le tout pouvant fortement impacter, localement au moins, la maturation cérébrale à un stade précoce (myélinisation, synaptogénèse, mort cellulaire dirigée).

Parmi les agressions connues, on retrouve des désordre endocriniens, des facteurs nutritionnels, une susceptibilité génétique, les déficits en facteur de

croissance, le stress oxydatif, l'inflammation et la production de certaines cytokines, l'infection maternelle, la dysplasie bronchopulmonaire, l'entérococolite ulcéronécrosante, les processus hypoxo-ischémiques.

Figure 1.8 : Séquence multifactorielle des agressions sur le cerveau en développement. (D'après Degos, 2008).



1.2.2.2.3.1 Excitotoxicité et lésions de substance blanche

Le glutamate est un neurotransmetteur majeur du système nerveux central. Il agit comme neurotransmetteur excitateur dans le cerveau mature, mais c'est également une molécule essentielle au développement cérébral : le glutamate intervient dans la survie, la prolifération, la migration neuronales, et la synaptogénèse. Il peut se lier à deux types de récepteurs :

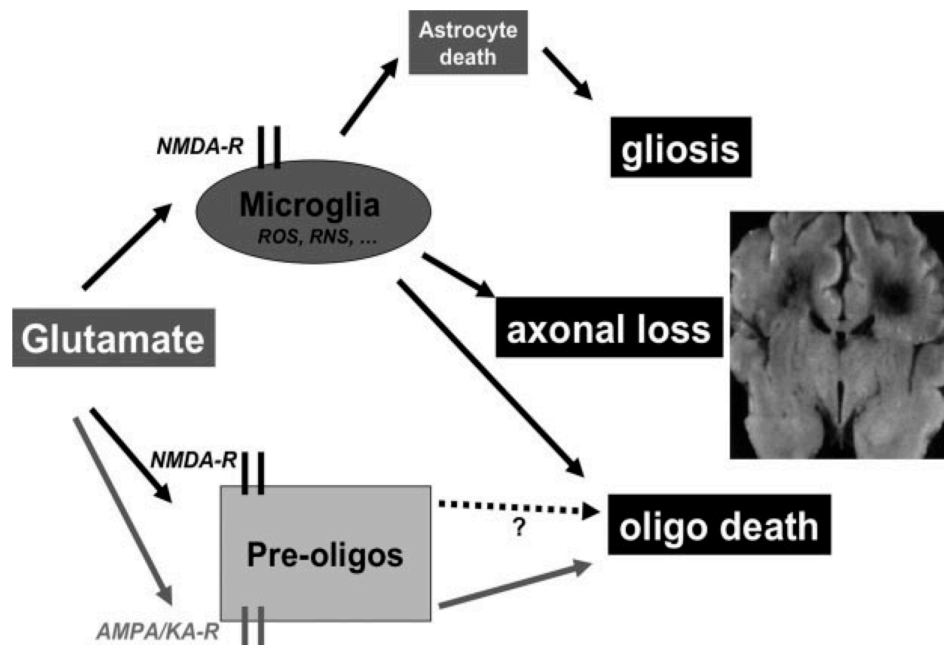
- Les récepteurs ionotropiques : ce sont des canaux transmembranaires, perméables en particulier au calcium en cas de stimulation. Parmi ces récepteurs : le NMDA N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, l'alpha-3-amino-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole (AMPA) et le kainate ;
- Les récepteurs métabotropiques : ce sont des récepteurs transmembranaires couplées à une protéine G, dont on dénombre à ce jour 8 isoformes (mGluR1 à R8).

Les récepteurs NMDA et AMPA sont transitoirement exprimés par les oligodendrocytes à certains stades du développement (Luján et al. 2005) et les récepteurs NMDA et métabotropiques sont exprimés et fonctionnels dans les microglies (Kaindl et al. 2012).

Une stimulation excessive des récepteurs au glutamate déclenche un influx calcique majeur responsable de l'activation de lipases, protéases, endonucléases, NO synthase. Plus encore cette activation diffuse de la cellule en

situation d'hypoxie aggrave une carence énergétique. A son maximum cette carence énergétique entraîne une dysfonction des pompes membranaires ATPase dépendantes et rapidement la lyse ou nécrose cellulaire. Si la situation est moins critique un processus d'apoptose peut s'engager (Martin et al. 2010).

Figure 1.9 : Excitotoxicité, résumé du processus. Implication des microglies, susceptibilité des oligodendrocytes. (D'après Degos, 2008).



Une injection intracérébrale d'agonistes du glutamate chez la souris au cinquième jour de vie induit des lésions qui miment celles observées dans le cerveau néonatal (Mesplès et al. 2005). Les injections d'iboténate (agoniste du récepteur NMDA (Tahraoui et al. 2001)) ou de S-Bromowillardiine (agoniste AMPA et Kainate) génèrent en substance blanche une astrogliose et des lésions kystiques évocatrices de leucomalacie focale. On observe également une activation des microglies et une mort des pré-oligodendrocytes.

A P7 chez le rat des résultats similaires sont obtenus après injection intracérébrale d'un agoniste du récepteur ionotrope AMPA. Dans un autre modèle de leucomalacie périventriculaire (hypoxie-ischémie chez le rat) l'utilisation d'un antagoniste du NMDA (Memantine) diminue la mort oligodendrocytaire, préserve l'épaisseur du cortex et la myélinisation (Manning et al. 2008).

1.2.2.2.3.2 Hypoxie

L'hypoxie est un facteur majeur. Elle débute souvent in utero sur des pathologies de placentation. Dans la théorie d'atteintes cumulées et séquentielles (multiple hit), elle se présente comme un facteur prédisposant in utero (Nyakas et al. 1996).

Plusieurs modèles animaux associent l'hypoxie à l'ischémie, et sont davantage des modèles d'accident vasculaire cérébral que de leucomalacie. Dans le modèle de ligature de carotide de Rice-Vannucci chez le rat à P6-P7, on observe avant tout des lésions de substance grise, mais également des pré-oligodendrocytes et des oligodendrocytes immatures. Réalisée plus tôt entre P1 et P3 cette ligature carotidienne induit essentiellement des lésions de substance blanche (Rice et al. 1981; Levison et al. 2001).

Chez le fœtus de brebis, l'installation d'une hypoxie durant les deux derniers tiers de gestation induit une leucomalacie focale et diffuse (E. C. Mallard et al. 1998).

Enfin une hypoxie gestationnelle chez le rat jusqu'à 24h avant la mise bas reproduit les stigmates humains d'une leucomalacie diffuse : inflammation, stress oxydatif, astrogliose, mort cellulaire augmentée en substance blanche, aspect atrophique de la substance blanche avec ventriculomégalie (Baud, Daire, et al. 2004a).

1.2.2.2.3.3 Stress oxydatif

Dans ces deux derniers modèles la réoxygénation brutale à la suite d'une hypoxie induit un stress oxydatif ; les oligodendrocytes y sont particulièrement sensibles. Nous avons vu plus haut les principaux acteurs du stress oxydatif et nitrosatif. Les pré-oligodendrocytes et les oligodendrocytes immatures ont un système de défense insuffisant face aux radicaux libres, isoprostanes, et à la peroxydation lipidique (Back et al. 1998; Back et al. 2005). Les enzymes superoxyde-dismutases (Zinc et Manganèse), glutathion peroxydase et catalase sont peu abondantes et peu efficaces (Folkerth et al. 2004; Baud, Haynes, et al. 2004b). Le système antioxydant devient plus robuste avec la maturation de la lignée oligodendrocytaire, qui perd alors cette vulnérabilité particulière (Baud, Haynes, et al. 2004b).

1.2.2.2.3.4 Inflammation.

L'inflammation est le dénominateur commun de nombreuses pathologies en néonatalogie, et le cerveau en développement est particulièrement vulnérable à certaines cytokines. Le lien entre inflammation périnatale et encéphalopathie du prématuré, suggéré dès l'identification de la leucomalacie (Virchow 1867), est bien établi en épidémiologie humaine : la chorioamniotite, une concentration élevée de cytokines dans le liquide amniotique ou le cordon

ombilical sont associées à des lésions cérébrales (Leviton et al. 1999; Yoon et al. 2000).

Les modèles animaux ont confirmé ce lien entre l'inflammation et les lésions cérébrales. Les modèles de chorioamniotite chez le lapin, la rate gestante, l'injection de LPS chez le fœtus de brebis, sont associés à des lésions de substance blanche et une inflammation microgliale diffuse (Lagercrantz et al. 2010; Burd et al. 2012; Hagberg & C. Mallard 2005). Récemment nous avons démontré la survenue de lésions cérébrales chez le raton subissant une septicémie à *E. coli* (Loron et al. 2010).

Les microglies sont le pivot de cette agression. Présentes en nombre vers 22 SA dans le cerveau, elles sont à même de produire des radicaux libres, des cytokines (Hagberg & C. Mallard 2005). Elles possèdent des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires, mais aussi au glutamate (Kaindl et al. 2012). Une activation microgliale est notée dans les modèles d'inflammation cérébrale (Loron et al. 2010), mais aussi dans les agressions hypoxiques (Baud, Daire, et al. 2004a) et excitotoxiques (Mesplès et al. 2005).

1.2.3 INTERACTION ANGIOGENESE ET DEVELOPPEMENT CEREBRAL

La vascularisation du parenchyme cérébral débute avec la migration d'hémangioblastes du mésoderme pour former des îlots puis des plexus vasculaires. C'est la vasculogénèse (formation de vaisseaux de novo).

A partir des plexus vasculaires établis autour du tube neural, le système nerveux va acquérir sa vascularisation par angiogenèse uniquement (prolifération de cellules endothéliales et ramification des capillaires à partir de vaisseaux existants). Les cellules endothéliales primitives prolifèrent, pénètrent radialement et de façon centripète dans la zone intermédiaire. Comme dans la migration neuronale et la croissance axonale, la prolifération endothéliale s'effectue selon des gradients de molécules chimiotactiques. En fait les deux processus partagent un certain nombre de mécanismes moléculaires.

1.2.3.1 VEGF et angiogenèse

Le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor) est LE facteur pro-angiogénique cérébral, via ses récepteurs tyrosine kinase VEGFR1 (flt-1) et VEGFR2 (flk-1 ou KDR). Le récepteur VEGFR2 s'autophosphoryle en présence de VEGF. Il induit et est nécessaire à la différenciation et à la survie endothéliale, mais aussi à la prolifération et la migration cellulaires (Koch et al. 2011). Le récepteur VEGFR1 lie également le VEGF-A avec une grande affinité, son inactivation induit des anomalies vasculaires sous forme de prolifération endothéliale excessive (Kearney et al. 2004). Schématiquement VEGFR1 pourrait réguler la présentation de VEGF-A à VEGFR2. Le récepteur Nrp-1 ne semble pas indispensable à l'angiogenèse (Gerhardt et al. 2004) mais agirait comme potentialisateur du signal VEGFR2.

Un gradient de concentration de VEGF attire les cellules endothéliales de la surface piale vers les cellules épendymaires qui bordent les ventricules (Carmeliet 2003; Autiero et al. 2005). Trois isoformes du VEGF-A résultent d'un épissage alternatif chez l'homme : VEGF121, VEGF165, VEGF189 en fonction du nombre d'acides aminés (120, 164, 188 chez la souris). VEGF189 possède deux domaines de liaison à l'héparine, VEGF165 un seul et VEGF121 aucun. En conséquence VEGF189 est une isoforme liée à la matrice extracellulaire, VEGF165 est modérément diffusible et VEGF121 est l'isoforme la plus diffusible. Un knock-out murin de VEGF-A induit un défaut majeur de vascularisation cérébrale et une apoptose neuronale diffuse, létale (Raab et al. 2004). L'expression d'une seule des isoformes de VEGF-1 suffit à corriger ces défauts, suggérant une redondance fonctionnelle de ces isoformes.

1.2.3.2 Autres facteurs d'angiogenèse

Les angiopoïétines (Angiopoïétine 1 et angiopoïétine 2) et leur récepteur Tie2 induisent une signalisation Shh (Sonic Hedgehog). Elles participent à la ramification vasculaire, au remodelage vasculaire. De même que VEGF, les angiopoïétines sont exprimées par les neurones moteurs (Nagase et al. 2005).

Le PDGF (platelet Derived Growth Factor) est indispensable au recrutement des péricytes et à leur adhésion aux cellules endothéliales via la N-cadhérine.

Un des récepteurs au TGF β , l'intégrine β 8, est indispensable à une vascularisation normale. Sa mutation est décrite dans un certain nombre de malformations vasculaires. Cette intégrine est exprimée par les astrocytes (Zhu et al. 2002).

La signalisation Notch1 et son ligand DII4 sont essentiels à la ramification vasculaire (Jakobsson et al. 2009).

La voie de signalisation wnt est également impliquée. En cas d'invalidation de cette voie des anomalies de vascularisation sont décrites (Zerlin et al. 2008).

Les sémaphorines sont des protéines membranaires impliquées dans la croissance du cône axonal et le développement vasculaire (Arese et al. 2011).

Nous avons déjà abordé plus haut le rôle de la thrombospondine, facteur qui inhibe l'angiogenèse via ses récepteurs CD36 qui inhibe la eNOS et surtout CD47 qui inhibe la sGC (Isenberg, Martin-Manso, et al. 2009a).

1.2.3.3 VEGF et développement cérébral

In vitro, VEGF-A induit la prolifération de progéniteurs astrocytaires et oligodendrocytaires (Silverman et al. 1999; Sundell et al. 1999) et augmente la ramification et la taille des neurones en culture primaire (Rosenstein et al. 2003). VEGFA est exprimé par les neurones moteurs, par les cellules gliales.

In vivo, la signalisation VEGFA – VEGFR (VEGFR1 ; VEGFR2 ; NRP1) est impliquée dans la neurogenèse. L'expression de VEGFR2 est associée, mais pas indispensable, à la survie neuronale (Ogunshola et al. 2002; Velde & Cleveland 2005). VEGFR1 exerce une régulation négative de la neurogenèse (en analogie avec son rôle en angiogenèse)(Wittko et al. 2009).

Deux hypothèses sont avancées pour expliquer la stimulation de la neurogenèse par VEGFA (Mackenzie & Ruhrberg 2012) :

- l'hypothèse « classique » où les vaisseaux nouvellement créés apportent des facteurs neurotrophiques, des nutriments et un support extracellulaire propice à la neurogenèse ;
- L'hypothèse d'une action directe du VEGFA sur les progéniteurs et l'expression de récepteurs appropriés.

La voie VEGF est impliquée en migration neuronale et guidance axonale. La modification de balance des isoformes de VEGF (de formes non diffusibles vers des formes diffusibles dans la matrice extracellulaire) altère la migration neuronale (Ruiz de Almodovar et al. 2010; Mackenzie & Ruhrberg 2012). NRP1 en liant VEGFA participe à la migration neuronale, en liant Sema3A induit la croissance axonale (Schwarz et al. 2004). Enfin l'association des sémaphorines et de VEGFR2 est impliquée en guidance axonale (Bellon et al. 2010).

1.2.4 Que nous apprennent les essais cliniques sur l'effet du iNO sur le système nerveux central ?

Les études cliniques sur l'utilisation du monoxyde d'azote inhalé ont souvent inclus un critère de jugement secondaire sur les complications et le devenir neurologique. Mais en fonction des études, les objectifs, les critères de jugement retenus, et, de fait, les résultats, sont contradictoires. Une des principales préoccupations était le risque d'hémorragie intraventriculaire de haut grade. En effet le monoxyde d'azote inhalé est un vasodilatateur, il modifie l'hémodynamique pulmonaire, éventuellement le besoin de ventilation mécanique et ce faisant la pression veineuse cérébrale, il augmente le temps de saignement (Högman et al. 1993), diminue l'agrégation plaquettaire (Cheung et al. 1998). Un deuxième objectif était soit de s'assurer de l'innocuité d'un traitement destiné à une utilisation prolongée chez des prématurissimes. Enfin on envisageait la possibilité d'un impact sur le pronostic neurodéveloppemental à long terme.

1.2.4.1 Pronostic neurologique à court terme

Le iNO diminue la sévérité des hémorragies intraventriculaires (Schreiber et al. 2003) mais pas leur incidence (Van Meurs et al. 2005). Pour Schreiber, les hémorragies intraventriculaires ne sont pas augmentées par le iNO, au contraire l'incidence des hémorragies intraventriculaires de grade III et de grade IV (les plus sévères) est diminuée (Schreiber et al. 2003). Ce dernier résultat est confirmé par Kinsella en 2006 (Kinsella, Cutter, et al. 2006a). Chez Van Meurs les hémorragies intracrâniennes sont plus fréquentes chez les moins de 1000g. Pour Ballard les complications cérébrales aiguës ne sont pas modifiées ni en gravité ni en fréquence (Ballard et al. 2006).

L'hétérogénéité de ces résultats s'explique en partie par la diversité des protocoles et populations étudiées. Par ailleurs la sévérité de la pathologie pulmonaire aggrave le pronostic neurologique à court, moyen et long terme.

1.2.4.2 Pronostic neurologique à long terme

Le développement neurologique à 30 mois n'est pas modifié pour l'étude anglaise de Bennett (Bennett et al. 2001), au cours d'une évaluation en aveugle selon l'échelle de Bayley, chez des anciens prématurés de moins de 32 semaines. Le petit effectif (25 enfants), la sévérité des patients inclus (seulement 60% de survie) et l'association dans cette étude à un essai de dexaméthasone (4 bras de traitement) limitent la portée de ces résultats.

A deux ans pour Mestan (Mestan et al. 2005), qui évalue à deux ans la cohorte décrite par Schreiber (Schreiber et al. 2003) le NO inhalé améliore nettement le pronostic neurodéveloppemental. Dans cette cohorte l'incidence des hémorragies intraventriculaires de haut grade était diminuée (cf ci-dessus).

Mestan rapporte une diminution de moitié des retard de développement modérés et sévères (scores de Bayley inférieurs à 70). L'évaluation à deux ans n'est bien entendue pas suffisante pour analyser le devenir à long terme, mais l'échelle de Bayley donne une première analyse cognitive en plus de la motricité fine. Très classiquement et de manière simpliste, en l'absence d'hydrocéphalie, les hémorragies de haut grade s'expriment régulièrement par des séquelles motrices. Or l'incidence des séquelles motrices "cerebral palsy" n'est pas modifiée dans cette cohorte. Autrement dit il n'est pas certain que l'amélioration du pronostic neurodéveloppemental ne soit imputable qu'à la seule diminution des hémorragies intraventriculaires de haut grade. Par ailleurs l'évolution pulmonaire est un facteur de confusion majeur dans l'évaluation des effets du iNO sur le développement à long terme.

1.3 HYPOTHESES DE TRAVAIL.

Le monoxyde d'azote est une molécule ubiquitaire, aux nombreux rôles. Nos connaissances sont encore incomplètes sur l'intégration de ses effets en fonction du contexte cellulaire. En effet en fonction de la concentration du NO, du contexte oxydatif, des processus de prolifération, quiescence ou apoptose, ces effets peuvent être diamétralement opposés. De manière simpliste : "protecteurs" ou "délétères".

Le monoxyde d'azote inhalé est largement utilisé chez le nouveau-né à terme comme vasodilatateur pulmonaire. Son usage n'est pas recommandé chez le prématuré en prévention de la dysplasie bronchopulmonaire. Chez l'animal, le NO inhalé a montré qu'il pouvait prévenir voire corriger les lésions de dysplasie bronchopulmonaire.

Un dogme a longtemps prévalu, d'une demi-vie très courte dans le plasma, interdisant tout effet à distance du NO inhalé. Mais des mécanismes de transport endovasculaire existent. Connaissant les susceptibilités du cerveau en développement et les rôles du NO dans le développement des vertébrés, cette hypothèse d'effets à distance doit être étudiée. D'ailleurs le pronostic neurologique des enfants traités n'est pas univoque : certains auteurs rapportent une modification des complications cérébrales immédiates, d'autres une modification du devenir à long terme.

Nous formulons l'hypothèse que l'inhalation de monoxyde d'azote pourrait influencer le développement cérébral.

Nous sommes partis de cette problématique clinique pour approfondir les propriétés fondamentales du NO endogène dans la maturation cérébrale. Nous avons utilisé le modèle raton nouveau-né, exposé pendant sa première semaine de vie à des concentrations de NO utilisées en clinique (5 ou 20 ppm)

Nous avons posé trois questions à ce modèle.

1/ Le monoxyde d'azote inhalé modifie-t-il le développement du cerveau sain, et par quel mécanisme ?

2/ Quel est son impact sur le tissu le plus susceptible du cerveau prématuré: la substance blanche ?

3/ Quelle est la qualité de cet impact sur un cerveau agressé ? Neutre, délétère ou protectrice ?

2 PRESENTATION DES RESULTATS ET ARTICLES

2.1 ARTICLE 1: EN PREPARATION.

LE MONOXYDE D'AZOTE INHALE AUGMENTE L'ANGIOGENESE CEREBRALE VIA LA CGMP

Gauthier Loron*, Paul Olivier*, Julien Pansiot, Hoa Pham Thi, Jérémie Dalous,
.../... Pierre Gressens, Olivier Baud.

* Both authors equally contributed to this work.

L'article est actuellement en préparation, en cours d'écriture. Néanmoins nous
avons inséré ci-après

- Les figures provisoires
- Le chapitre des méthodes provisoire.

L'utilisation du monoxyde d'azote inhalé est répandue - bien que controversée - chez les prématurés, dans deux indications.

- D'une part le monoxyde d'azote inhalé est utilisé en traitement adjuvant en cas de détresse respiratoire hypoxique ou d'hypertension artérielle pulmonaire (plus fréquente vers le terme), on utilise alors les propriétés myorelaxantes et vasodilatatrices du NO pour diminuer les besoins en oxygène et optimiser le rapport ventilation/perfusion pulmonaire.

- D'autre part le monoxyde d'azote dans des modèles expérimentaux animaux prévient voire corrige des lésions de dysplasie bronchopulmonaire, une des complications majeures de la grande prématurité. La physiopathologie de cette dysplasie repose notamment sur un défaut d'alvéolisation et de maturation vasculaire. Physiologiquement le NO est un maillon de cette maturation vasculaire comme effecteur secondaire naturel du Vascular Endothelial Growth Factor dans le poumon. Chez l'animal on a montré la possibilité au NO inhalé de diffuser de l'alvéole au cytoplasme des cellules endothéliales, d'y trouver ses cibles (production de cGMP) et de reproduire une signalisation VEGF. La stimulation de l'angiogenèse pulmonaire participe au développement d'une alvéolisation normale dans de nombreux modèles animaux. Malheureusement chez le prématuré humain il n'a pas encore été fait la preuve de l'efficacité d'une prophylaxie par iNO dans la dysplasie bronchopulmonaire.

Notre connaissance du catabolisme du NO s'est longtemps réduite à son inactivation par l'hémoglobine pour former de la méthémoglobine et des nitrites. Ce radical très réactif possède une demi-vie plasmatique brève (fourchette de quelques millisecondes à une demi-seconde selon les auteurs). Cette inactivation rapide dans le secteur vasculaire garantissait une action purement "locale" à ce NO inhalé, ce qui a participé à son adoption en néonatalogie.

Pourtant de nombreuses observations expérimentales ont remis en cause ce dogme. Les travaux sur la vasodilatation hypoxique ont mis en évidence un métabolisme complexe du monoxyde d'azote, endovasculaire, associant l'hémoglobine et les érythrocytes, les nitrites et les S-nitrosothiols. Il existe un réservoir endovasculaire de NO, sous forme de nitrite ou de NO fixé à des résidus thiols (S-nitrosohémoglobine, S-nitrosalbumine, S-nitrosothiols). L'hémoglobine en condition hypoxique (conformation T) exercerait une fonction de nitrite réductase, formant du NO à partir de nitrite. Alternativement, le radical NO pourrait être déplacé de résidu thiol en résidu thiol par transnitrosylation, lui assurant une demi-vie plasmatique plus longue et des effets biologiques à distance (Stamler et al. 2012).

Enfin, les études cliniques qui ont étudié le devenir à long terme des prématurés rapportent une influence de l'inhalation de NO sur le développement neurologique. En particulier selon Mestan, l'inhalation de NO en période néonatale s'accompagne d'une amélioration du quotient de performance à 2 ans mesuré selon l'échelle de Bayley (Mestan et al. 2005).

Nous pensons que le NO inhalé pourrait avoir un impact à distance sur le cerveau sain en développement. Son effet bénéfique ou délétère doit être analysé. Pour analyser cette hypothèse, nous avons mis au point un modèle d'inhalation de NO chez le raton nouveau-né.

Méthodes

Nous avons placé des portées Sprague-Dawley en chambre normoxique, normocapnique du dernier jour de gestation au 7^e jour post-natal. Les portées contrôles sont exposées à de l'air seul, le groupe "NO" à un mélange air et monoxyde d'azote. La concentration de monoxyde d'azote, 5 ou 20ppm pour reprendre des concentrations utilisées en clinique, est étroitement régulée par un moniteur iNovent™, tout comme la concentration de NO₂ qui est maintenue en deçà de 1ppm. Au delà du septième jour, tous les animaux sont à nouveau élevés en air. Pour s'affranchir d'un effet maternel ou d'un effet sexe, les mères étaient régulièrement échangées, et le sex ratio des portées était équilibré à 1. L'inhalation de NO à 5 ou 20ppm chez ces animaux à la fonction pulmonaire normale n'entraîne pas de modification de leur gazométrie artérielle, ni de méthémoglobinémie significative.

Nous avons étudié les cibles et relais connus du monoxyde d'azote : angiogenèse, voie du cGMP cyclique, facteurs de transcription, dans le parenchyme cérébral ainsi que les effecteurs possibles des effets du iNO, par immunohistochimie, protéomique et RT-PCR.

Impact du monoxyde d'azote inhalé sur l'angiogenèse cérébrale

Connaissant les effets pulmonaires du NO inhalé, nous avons d'abord étudié l'angiogenèse cérébrale. Nous avons utilisé les marquages de deux transporteurs endothéliaux : MCT1, GLUT1 en immunohistochimie. Nous avons quantifié la densité des capillaires à l'aide d'une grille orientée parallèlement à la scissure interhémisphérique à grossissement X200, sur des coupes de 7µM. Pour chaque champ nous avons dénombré les intersections entre les capillaires et les lignes de la grille, nombre qui reflète à la fois la densité et la longueur des capillaires. Nous constatons une augmentation importante et diffuse de l'angiogenèse, en substance grise comme en substance blanche, à P14. Ainsi en cortex cingulaire l'angiogenèse est augmentée de 55% à P14 chez les animaux inhalant 5 ou 20ppm de NO. Ce phénomène est transitoire puisqu'à P21 la densité vasculaire est identique dans les deux groupes. Ainsi, comme cela a été démontré dans le poumon, l'inhalation de monoxyde d'azote s'accompagne d'une augmentation de l'angiogenèse à l'étage cérébral.

Le monoxyde d'azote inhalé corrige les effets d'une inhibition de la synthèse endogène de NO.

A ce stade une participation du NO endogène à cet effet pro-angiogénique ne peut pas être écartée.

En RT-PCR et western blot, nous n'avons pas observé d'influence du iNO sur l'expression des gènes des NOS ou la traduction de leurs ARN messagers que ce soit à P1, P7 ou P14.

Nous avons bloqué l'activité des trois NOS endogènes par un inhibiteur pharmacologique non spécifique, le L-Name. Nous avons traité les rates gestantes puis les portées par 15mg/kg/12h de L-Name injecté par voie intrapéritonéale de E20 à P7. Nous avons constaté une diminution significative de la croissance pondérale et du poids cérébral chez les animaux recevant du L-Name par rapport aux contrôles. L'effet pro-angiogénique du iNO n'est pas inhibé par l'injection de L-Name. Par ailleurs, en utilisant le même protocole, nous avons montré que le L-Name induit un retard majeur de myélinisation à P7 et P14, que le monoxyde d'azote inhalé corrige. L'effet pro-angiogénique du iNO s'affranchit des NOS, et le iNO peut suppléer à un déficit de la synthèse endogène de NO. Au delà, ces résultats sont une première indication que l'inhalation de NO induit un relargage de NO lui-même et moins probablement d'un dérivé aux effets biologiques propres.

L'effet pro-angiogénique du iNO semble indépendant de VEGF.

Zhang, dans un modèle d'accident vasculaire cérébral chez le rat, a montré que l'effet pro-angiogénique du NO inhalé était médié par le VEGF (zhang 2003). De plus dans le poumon, le NO inhalé induirait cette activation de VEGF via une modulation du signal hypoxique médié par HIF-1 (Han 2006).

Quantifiés par ELISA à P1, P7 et P14, les taux de VEGF sérique des deux groupes sont comparables. En revanche le taux de VEGF mesuré par ELISA dans le parenchyme cérébral (perfusé) baisse significativement à P1 au cours de l'inhalation de 5 ou 20 ppm de NO. A P7 et P14 les taux sont identiques aux contrôles.

En RT-PCR, nous n'avons pas constaté de différence d'expression du gène VEGF-A à P1, P7 ou P14 au sein du parenchyme cérébral.

En Western Blot et RT-PCR, nous n'avons pas observé de modification d'expression ou de concentration des récepteurs au VEGF : VEGFR1 et VEGFR2, à P7 ou P14.

Enfin la cascade de signalisation "classique" immédiatement en aval de VEGF, à savoir Erk/Akt, n'est pas activée par l'inhalation de NO : en Western Blot, nous n'avons pas observé de modification de concentration de Erk 1, Erk2, Akt.

Enfin nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique du récepteur R2 du VEGF, le SU-5416 (3-[(3,5-Dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one, Tocris®). Ce traitement a été injecté du E20 à P7, soit pendant toute la durée d'exposition au NO, par voie intrapéritonéale à dose de 10mg/kg/24h. Nous avons constaté une diminution sévère de l'angiogenèse et de la myélinisation dès P7 chez les animaux recevant du SU-5416 (marquages MCT1, GLUT1 et MBP en immunohistochimie). En revanche les animaux recevant du SU-5416 et du NO à 5ppm présentent une angiogenèse et une myélinisation comparables aux contrôles. Les résultats concernant la myélinisation seront détaillés plus loin, dans l'article "Nitric oxide plays a key role in myelination in the developing brain".

Au total l'effet pro-angiogénique du NO est indépendant d'une activation du VEGF. De plus le NO inhalé peut corriger l'impact majeur d'un inhibiteur du VEGFR2 sur le développement cérébral. Les effecteurs du NO inhalé interviennent en aval du VEGF ou se situent sur une autre voie de signalisation.

Rôle du nitrite dans les effets à distance du monoxyde d'azote.

L'inhalation de NO à 5 ou 20ppm s'accompagne d'une augmentation du taux circulant de nitrate (NO₃⁻) et nitrite (NO₂⁻) selon un effet-dose, à P1 et à P7. De même au sein du parenchyme cérébral, sur cerveau perfusé. Ainsi les animaux inhalant 20ppm de NO présentent une concentration sérique de nitrate et nitrite plus de 300 % supérieure aux contrôles, et de 150% dans le parenchyme cérébral.

Pour évaluer le rôle de ces dérivés du NO, nous avons administré aux rates gestantes puis aux rats, de E20 à P7, du nitrite de sodium par voie intrapéritonéale à dose de 40mg/kg/8h. Nous obtenons des concentrations circulantes de nitrite équivalentes aux taux des animaux inhalant du NO.

L'exposition au nitrite s'accompagne d'un effet pro-angiogénique cérébral. A p14, les animaux injectés par nitrite présentent une augmentation de 25% du marquage vasculaire MCT1 dans le cortex cingulaire. Nous avons également identifié une augmentation de la myélinisation dans ces conditions. L'injection de nitrite restaure - au moins partiellement - le phénotype cérébral observé chez les animaux inhalant du NO.

Le monoxyde d'azote inhalé est relargué au système nerveux centrale et reproduit les effets intracellulaires du NO endogène : activation de la voie du cGMP.

Par voltamétrie, nous avons analysé les variations corticales de la concentration de NO par électrode de carbone à P5. L'inhalation de 20ppm de NO s'accompagne d'une augmentation de 140% par rapport au niveau basal. Cette augmentation de NO persiste malgré l'inhibition des NOS par le L-Name,

et est reproduite par l'injection de donneur de NO (Diethylamine NONOate, 50mg/kg). Ces résultats sont en cours de confirmation, mais ces observations sont en faveur d'une libération de NO au cerveau.

Nous avons étudié la concentration en cGMP par ELISA après 1h d'exposition à 5ppm de NO. Les animaux inhalant du NO présentent un taux 5 fois plus élevé que les animaux exposés à l'air seul, dans leur parenchyme cérébral fronto-pariétal.

En aval de la signalisation par le VEGF, plusieurs facteurs proangiogéniques sont connus : nous n'avons pas observé de différence d'expression à P1 ou P7 des gènes de l'angiopoïétine 1 ou 2, ou Ti2. En revanche l'inhalation de NO entraîne une diminution significative de l'expression du gène de la thrombospondine 1. Cette protéine est un anti-angiogénique impliqué dans la régulation de la signalisation par le NO. Avec le partenariat d'Abbott, qui nous a fourni un agoniste de synthèse du récepteur de la thrombospondine 1 (ABT510), nous avons étudié l'effet d'un blocage de la signalisation pro-angiogénique du NO endogène. Nous avons injecté ABT510 par voie intrapéritonéale à dose de 100mg/kg/24h. Le ABT510 induit une diminution nette de la densité capillaire à P7 et P14 dans notre modèle. Chez les animaux injectés par ABT510 et exposés au NO, la densité vasculaire reste inférieure aux contrôles.

L'ensemble de ces résultats démontre l'existence d'effets à distance du monoxyde d'azote inhalé. L'inhalation de NO à 5 ou 20ppm entraîne une augmentation de l'angiogenèse cérébrale, indépendante de la voie du VEGF. Cette inhalation est indépendante de la synthèse de NO endogène et peut pallier à son déficit. De plus les relais intracellulaires classiques de la signalisation par le NO sont impliqués : voie de la cGMP, thrombospondine. Ces résultats suggèrent le relargage à la cellule endothéliale de NO lui-même, qui agit de la même manière que le NO produit par les NOS, plutôt que l'activité biologique de dérivés du NO, comme des protéines nitrosylées. Dans ce contexte le nitrite pourrait jouer le rôle de réservoir et de transport endovasculaire de NO.

MATERIAL AND METHODS / DRAFT

Animal Models. All experiments were carried out in compliance with the ethical rules of INSERM. Mother rats (Sprague-Dawley; Janvier, Le Genest-St-Isle, France) and their pups were placed in a normoxic, normocapnic gas chamber containing 5 ppm of NO for postnatal days (P) 0 to 7. The concentrations of NO and NO₂ (lower than 1 ppm) were monitored using the iNOvent system (Ikaria, Clinton, NJ). To determine the specific effects of iNO on rat pups, the mothers were changed daily from exposed to unexposed experimental groups. Control and iNO-exposed animals were treated similarly in 2 identical Plexiglas chambers in the same room. After the exposure periods, rat pups were maintained in the same room under strictly similar conditions.

In each experimental group, we studied 6 to 10 pups on P1, P7, P14 in three separate experiments. Animals were sacrificed under anaesthesia with inhaled isoflurane (Abbott France, Rungis, France). Brain tissues were immersed in formol 4% during 5 days, embedded in paraffin and cut into 7-mm-thick sections for immunochemistry ; or immediately frozen in liquid nitrogen for molecular biology or proteomics purposes. If necessary rat pups were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (0,12 mol/L) or phosphate buffer (PBS) only before brain removal. Plasma was extracted from whole blood get by decapitation, after 20 min decantation on ice, and 15 min centrifugation at 1500 rpm.

To investigate the effect of either endogenous NO production or exogenous iNO on the developing brain, we pharmacologically blocked all NO synthases (NOSs) with N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 15 mg/kg twice a day given intraperitoneally from P0 to P7). To assay VEGF pathway role in inhaled nitric oxide effect, we pharmacologically blocked VEGF receptor 2 with SU 5416 (Tocris, Bristol, UK); 10 mg/kg injected intraperitoneally twice a day from P0 to P7. To investigate role of Thrombospondin-1 (TSP1) as a gatekeeper of NO pathway, we used pharmacologic agonist ABT-510 developed by Abbott (Abbott Park, US-IL) and generously provided through transfert Agreement N°45068. A 100mg/kg dose was intraperitoneally injected every 12 hours.

Immunohistochemistry. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and Glucose transporter 1 (GLUT1) markers were used to visualize all vessels. Olig2 marker was used to visualize all oligodendrocytes, APC and MBP to detect post-mitotic

oligodendrocytes and myelinated fibers, respectively. Primary antibody was visualized using the streptavidin-biotin-peroxydase method, as previously described (Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA). Olig2/APC co-labeling was performed with secondary antibodies coupled to the green fluorescent marker Fluoroprobe S488 (Interchim, Montluçon, France) or red fluorescent marker cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA) fluorescent markers as previously described (Baud 2004 brain pathol)

Immunolabeling quantification. All quantitative measurements were done by two observers who were blinded to the experimental group of the studied animal. Immunoreactive cells and vessels were counted in cingular cortex and underlying white matter, and in the striatum (+2.16 to 20.36 mm from the bregma) on at least 4 continuous sections (alternatively in right or left hemisphere) at P1, P7, P14. Immunoreactive cells were counted within a randomly-oriented, 0.065 mm² grid at x400 magnification. Vessels were counted as number of vessels intersections with the grid's lines, apart intersection with lower or left boundaries, to take length and dichotomy of vessels in account. At x400, spacement between two lines of this 10 x 10 lines grid is 0,028mm. The optical density (OD) of MBP+ fibers was measured in the cingulum in coronal sections because of the white matter thickness in this area. At least 4 sections each from 6 to 10 animals per group were examined. Optical densities were measured at x100 magnification using a computerized image analysis system (ImageJ, NIH, MA) as previously described (Olivier et al., 2010).

VEGF quantification. We used specific ELISA assays from R&D system Europe (Lille, France) to quantitate VEGF in plasma and in whole, PBS-perfused brain samples according to the manufacturer's instructions.

cGMP measurement. Cayman's competitive enzyme immunoassay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) was used to quantify Guanosine 3',5' cyclic monophosphate (cGMP) in forebrain, according to manufacturer's instruction.

Intracellular nitric oxide assessment. To detect nitric oxide in brain cells we used a cell permeable fluorescent probe (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate or DAF-FM DA, Molecular Probes, Leiden,

Netherlands). Four group of pups were constituted depending on Nitric oxide inhalation and NOS inhibitor (L-Name) injection. Brain was quickly removed and frozed in liquid nitrogen, then sliced on cryostat (20µM thickness). Slides were incubated in DMEM at 37°C in obscurity, then 1 hour in DAF-FM DA 10µM according to manufacturer's instructions, then rined twice in PBS, co labelled with DAPI 1/10000 and revealed using fluorescent microscopy.

Nitrate/Nitrite involvement. Chemoluminescent kit (Cayman) was used to measure NO₂ and NO₃ levels in plasma and brain. For this latter, forebrain cortex and wthite matter were homogenized then ultracentrifugated at 100.000g in ultrapure PBS for 30 minutes and Nitrate/nitrite were assessed in supernatant. To assess effect of Nitrite/nitrate raise on brain angiogenesis, we treated rat pups from P0 to P7 with a 40 mg/kg sodium nitrate intraperitoneal injection every 8 hours. A kinetic study was performed after a single injection of sodium nitrate.

Western Blot. Membrane proteins were extracted from forebrain cortex, including white matter, taken in P1, P7 or P14 rat pups. Extraction was achieved by homogenization in Hepes buffer containing protease inhibitors from Sigma, according to the manufacturer's instructions. We loaded 30 mg of protein from each sample and incubated overnight with either a NOS 1, NOS2, NOS3, VEGFR1, VEGFR2, sGKalpha/Beta, Akt, pAkt, ERK1/2 or pERK1/2 antibody or an anti-a-actin antibody. Western blot experiments were run in triplicate with 4 animals (Antibody list).

Quantitative Polymerase Chaine reaction. DNA-free total RNA from the brain cortex including white matter was obtained at P1, P7, and P14 using Qiagen RNeasy lipid tissue kits (Qiagen, ref). To standardize gene expression across samples, we first compared the expression levels of 4 housekeeping genes within the samples (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH], b2-microglobulin, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase [HPRT], and b-glucoronidase). For reverse transcription (RT), we used 600 ng AQ5 of total RNA and the Iscript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was set up with Supermix (Bio-Rad) containing SYBR green for 50 cycles with a 3-step program (11). Each reaction was run twice with at least 6 animals per group; in both cases, samples were assessed in triplicate. The applied primers for real- time PCR are listed in Table,

Statistical Analysis. All data were reported as mean \pm SEM. We used t-test to compare quantitative variables between two groups. Either 1- or 2- way analysis of variance was performed with age and groups as the factors, and the Tukey post hoc test was used. Statistical tests were run on GraphPad Prism version 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA).

2.2 ARTICLE 2 : NITRIC OXIDE PLAYS A KEY ROLE IN MYELINATION IN THE DEVELOPING BRAIN.

Gauthier Loron*, Paul Olivier*, Romain Fontaine, Julien Pansiot, Hoa Pham Thi, Christiane Charriaut-Marlangue, Jean-Léon Thomas, Jean-Christophe Mercier, Pierre Gressens, Olivier Baud.

* les deux auteurs ont également participé à ce travail.

Journal of Neuropathology & Experimental Neurology

August 2010, Volume 69, Issue 8, p828-837

Les lésions de substance blanche, qui regroupent les leucomalacies de forme kystique et diffuse, sont une des complications majeures de la grande prématurité. La part motrice des séquelles de la grande prématurité a longtemps été au premier plan dans le suivi des prématurés. En témoignent les définitions - anciennes - d'infirmité motrice cérébrale ou Cerebral Palsy qui font exclusivement référence à la motricité. Avec les progrès récents en néonatalogie, l'histologie des lésions s'est modifiée, de la forme kystique à la forme diffuse (Leviton & GILLES 1996). Parallèlement, le phénotype des séquelles a changé. La cohorte Epipage l'a bien montré, les prématurissimes des années 2000 sont avant tout exposés aux séquelles cognitives, comportementales et aux troubles complexes des apprentissages qu'aux séquelles motrices. Plus du tiers des enfants nés avant 31 SA ont un quotient de développement inférieur ou égal à 85 à 5 ans (Larroque et al. 2008).

La genèse de ces lésions est multifactorielle, avec au premier plan inflammation, hypoxie-ischémie et stress oxydatif, excitotoxicité.

L'étude du NO dans le cerveau en développement est d'autant plus intéressante que cette molécule est impliquée dans bon nombre des agressions sur la substance blanche. Comme effecteur du tonus vasculaire et régulateur du débit régional cérébral le NO est sollicité dans les processus hypoxo-ischémiques. Abondamment synthétisé dans les réactions de défense antibactérienne, le NO est impliqué dans l'inflammation cérébrale, l'activation microgliale ou macrophagique.

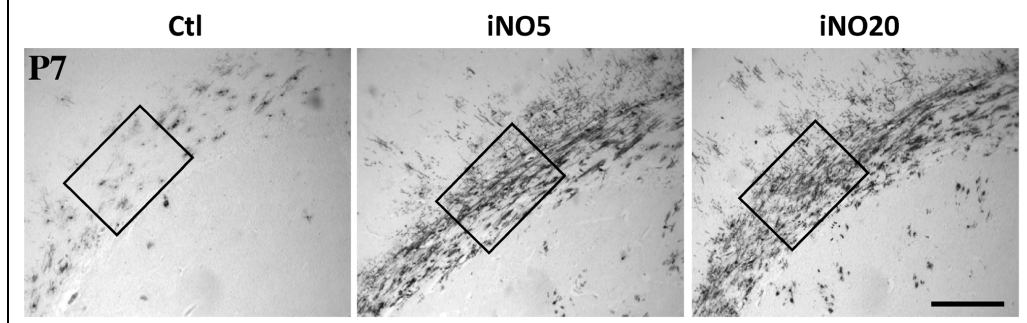
Il existe à présent beaucoup d'arguments pour un métabolisme et un transport du NO dans la circulation. Nous avons montré que le NO inhalé peut être relargué à distance, stimuler la synthèse de cGMP, augmenter l'angiogenèse cérébrale.

Qu'en est-il de son impact sur le développement de la substance blanche en cerveau sain ? Nous l'avons étudié dans notre modèle de raton précédemment décrit. Cette démarche nous permet également de préciser le rôle du monoxyde d'azote endogène dans le développement physiologique de la substance blanche. Nous pouvons dès lors évoquer le potentiel délétère ou neuroprotecteur de ce médicament à la galénique innovante.

Le monoxyde d'azote inhalé est un promoteur de la myélinisation chez le raton.

L'exposition des ratons au NO à 5 ou 20 ppm est associée à une augmentation de 40% de la densité en myéline à P7 et P14, en immunohistochimie. Ce résultat est corrélé à l'étude en western blot de la protéine MBP, ainsi qu'à l'expression de son ARN messenger. L'étude immunohistochimique de marqueurs neuronaux (marqueur axonal RT-97 et GABA) n'a pas montré d'effet du iNO sur la structure corticale.

Figure 2.2.1 : Augmentation de la densité de myéline à P7 selon l'exposition au iNO. Immunohistochimie MBP en substance blanche péricalleuse.



A P21 il n'est plus observé de différence entre les animaux contrôle et ceux ayant inhalé du monoxyde d'azote.

Ces résultats ont été retrouvés dans l'espèce murine C57BL/6 GFP-PLP. Dans cette souche, la protéine de la myéline PLP (myelin proteolipid protein) fluoresce dans le vert. Exposées au NO, ces souris présentent à P10 une augmentation de densité de PLP et de MBP dans la substance blanche péricalleuse et dans le striatum.

Nous avons étudié l'ultrastructure de cette myéline plus abondamment produite chez le rat à P14. Sa structure est normale en microscopie électronique.

Nous avons étudié la qualité fonctionnelle de cette myéline à l'aide de tests comportementaux. Les animaux adultes présentaient les mêmes aptitudes que les animaux contrôle. Sur le test en champ ouvert ("open field") le territoire exploré est identique dans les deux bras. Au test de l'objet nouveau, les animaux des deux groupes privilégient de la même manière l'exploration de l'objet inconnu.

L'ensemble de ces résultats suggère que le monoxyde d'azote inhalé induit la formation précoce d'une myéline normale. Le monoxyde d'azote inhalé pourrait exercer un effet pro-maturatif sur la substance blanche

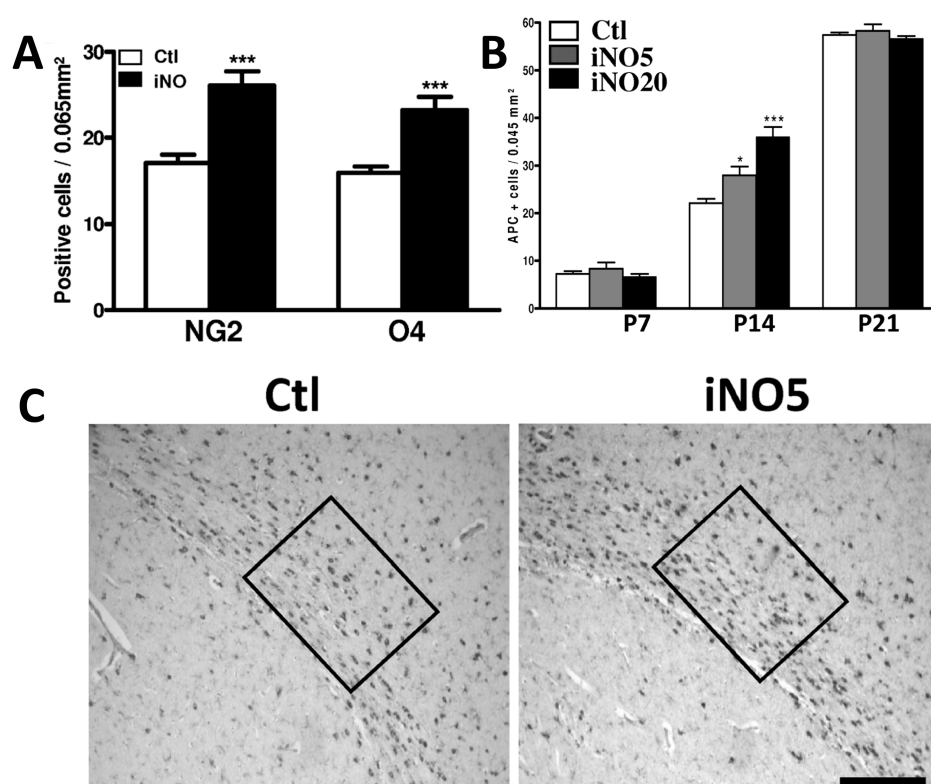
Quels en sont les déterminants cellulaires ?

Prolifération et maturation de la lignée oligodendrocytaire.

L'exposition au NO inhalé induit une prolifération cellulaire à P7 en substance blanche, révélée par le marquage KI67. La population totale des oligodendrocytes est également légèrement accrue à P7 (marquage Olig2). A cet âge, nous dénombrons 40% de pré-oligodendrocytes en plus (marquage NG2, O4) chez les animaux inhalant du NO par rapport aux contrôles. Cet accroissement de la population oligodendrocytaire se reporte à P14 sur les

formes matures, myélinisantes, marquées par APC, plus nombreuses de 22% sous iNO à 5ppm et de près de 40% sous iNO à 20ppm. Enfin les cellules de la substance blanche en apoptose, marquées par la technique TUNEL, sont en nombre équivalent dans chaque groupe.

Figure 2.2.2 : Prolifération et maturation de la lignée oligodendrocytaire. **A :** Augmentation du pool d'oligodendrocytes immatures sous iNO (marquage NG2 et O4). **B et C :** Augmentation du pool d'oligodendrocytes matures sous iNO (marquage APC dans le corps calleux latéral).



Cette maturation oligodendrocytaire est confirmée par analyse de marqueurs protéiques : le facteur de transcription PDGFR α , impliqué dans la différenciation de l'oligodendrocyte, voit son expression significativement augmentée à P3 et à P10 en cas d'inhalation de NO. Ce résultat est confirmé en western blot.

La balance des sémaphorines 3A et 3F, impliquée dans le chimiotactisme oligodendrocytaire est également modifiée. La sémaphorine 3F, facteur attractif de la migration oligodendrocytaire, est davantage exprimée à P7 (PCR et Western Blot).

Au total, le monoxyde d'azote inhalé induit une prolifération oligodendrocytaire, sans augmentation de l'apoptose. Ces nombreux pré-

oligodendrocytes mûrent ensuite de manière précoce pour donner une population plus abondante d'oligodendrocytes myélinisants.

L'inhibition de la synthèse endogène de NO induit des troubles sévères de la myélinisation et de comportement, corrigés par le NO inhalé.

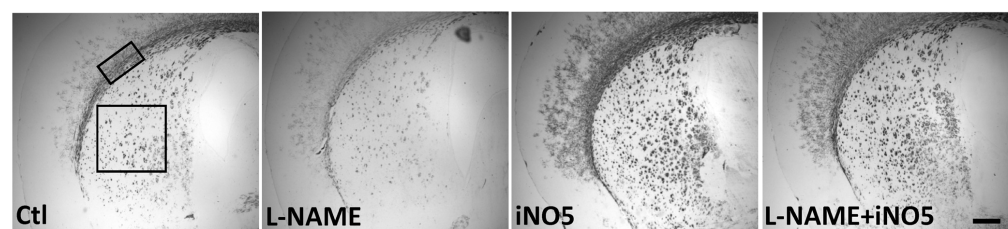
Afin de déterminer la participation physiologique du NO endogène dans ces processus de myélinisation, nous avons inhibé l'activité des NOS par un inhibiteur pharmacologique non spécifique : le L-Name. L'injection intrapéritonéale de 30mg/kg/j de L-Name, de P0 à P7, induit un défaut de myélinisation sévère à P14 dans la substance blanche péricalleuse et dans le striatum. Ce défaut de myélinisation est transitoire et n'est pas retrouvé chez l'animal adulte.

L'inhalation contemporaine de 5ppm de NO restaure une myélinisation comparable aux animaux contrôle à P14.

Ce défaut sévère de myélinisation à P14 chez les animaux L-Name est corrélé à de moins bonnes performances aux tests comportementaux. A l'âge adulte les rats exposés au L-Name ne manifestent pas le même intérêt pour l'objet déplacé ou pour l'objet nouveau que les animaux contrôle.

La normalisation histologique chez les animaux L-Name exposés au NO est corrélée à une amélioration fonctionnelle : ces animaux explorent les objets nouveaux ou déplacés de manière identique aux contrôles.

Figure 2.2.3 : l'inhalation de iNO à 5ppm corrige le retard de myélinisation induit par le blocage des NO Synthases (marquage MBP, corps calleux et striatum)



Ces expérimentations suggèrent :

- que le NO endogène est nécessaire à une myélinisation normale à P14 dans les régions étudiées ;
- que le NO exogène est capable de pallier à un défaut de production de NO endogène, pour restaurer une myéline histologiquement et fonctionnellement normale.

L'ensemble de ce travail pointe le rôle majeur du monoxyde d'azote endogène dans le développement physiologique de la substance blanche. Nous soulignons également le potentiel du monoxyde d'azote inhalé à influencer la maturation du système nerveux central.

Au delà, l'effet maturatif du iNO sur la lignée oligodendrocytaire pourrait diminuer la sensibilité de cette dernière aux agressions multiples de la période néonatale. Le NO ou ses dérivés pourrait alors se montrer protecteur dans les lésions de substance blanche, bénéficiant de plus d'une voie d'administration tout à fait originale.

NITRIC OXIDE PLAYS A KEY ROLE IN MYELINATION IN THE DEVELOPING BRAIN.

Gauthier Loron*, Paul Olivier*, Romain Fontaine, Julien Pansiot, Hoa Pham Thi, Christiane Charriaut-Marlangue, Jean-Léon Thomas, Jean-Christophe Mercier, Pierre Gressens, Olivier Baud.

* les deux auteurs ont également participé à ce travail.

Journal of Neuropathology & Experimental Neurology

August 2010, Volume 69, Issue 8, p828-837

Lien pour Texte intégral :

<http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.7.1b/ovidweb.cgi?QS2=434f4e1a73d37e8c740ce3cde7a3378589f4118e11f53e89a15a64745831b291115f4957754737cfa9dcb08fa8ef2c001c4d42a95785fd2cdf3c2af5adda213ae8b5d6024a2903d45ace05e6c9eb5d1f4775ecb41d8ad6318bcfda79252eca15ae0311dd31a0541cf21f360f725f40f43fb6b1b40f22b76572ba8b3c7c19a2ba09b9337d3f718d2623f1f8e40097588f8f2903f19507461f1b5bf512e5848ba6d38a1dd24890c975db12c556d5ed253690f7b1857a656a4ea607a4c69845356fe755267a973b5d91f169538316114a8e7d4f42034c5c309a4f3079865992d7020de41b2f9529985cfc6609404c82d0861d02f679ecc318bfe733c50cdb952a22323baf94519f67c617effdb15769201f5ad1187cab1042e5f5996856940023dcd96a60b912edd97b7c8d2bfff2b1637474a20187272e6d31ac7d8a817629734532346993164ea58fee43e3c200e0e8e506abbfa13c5aa60b5209316fbf8ad7a4884adceec89129dbc51fef6a80efe7a9ec2abac612a2663a7de4d65881ff42f05f99a2a7c4347ff0b0ce91776861bf0e6791599a5f8e3edf>

**2.3 ARTICLE 3 : NEUROPROTECTIVE EFFECT OF INHALED NITRIC
OXIDE ON EXCITOTOXIC-INDUCED BRAIN DAMAGE IN
NEONATAL RAT.**

Julien Pansiot, Gauthier Loron, Paul Olivier, Romain Fontaine, Christiane
Charriaut-Marlangue, Jean-Christophe Mercier, Pierre Gressens, Olivier Baud

PLoS ONE

June 2010, Volume 5, Issue 6, e10916

L'origine des lésions de substance blanche est multifactorielle : hypoxie-ischémie, inflammation, stress oxydatif, déficits hormonaux et en facteurs de croissance (Martin et al. 2010). Le monoxyde d'azote est impliqué dans plusieurs de ces agressions vu son rôle dans le tonus vasculaire, la perfusion cérébrale, le stress oxydatif. Il participe également au stress excito-toxique en tant que second messenger de certains récepteurs NMDA. La substance blanche immature possède une vulnérabilité particulière à l'excitotoxicité en raison de l'expression transitoire par les pré-oligodendrocytes de récepteurs fonctionnels au glutamate (Volpe et al. 2011).

Dans l'article précédent (Olivier et al. 2010), nous avons démontré l'effet promaturatif du monoxyde d'azote inhalé sur cerveau sain. Nous avons souhaité évaluer le potentiel neuroprotecteur du NO sur la substance blanche, en cas d'agression excito-toxique. En particulier nous avons étudié si la maturation de la substance blanche induite par le NO inhalé s'accompagnait d'une diminution de sa sensibilité à l'excito-toxicité.

Nous avons utilisé le modèle de lésion de substance blanche par excitotoxicité développé dans le laboratoire (Mesplès et al. 2005). Dans ce modèle, l'injection intracérébrale d'analogues glutamatergiques induit des lésions typiques de leucomalacie périventriculaire. Ce protocole a été combiné à l'inhalation de NO. Les portées sont placées en chambre normoxique, normocapnique du dernier jour de gestation au 7^e jour post-natal. Les portées contrôle sont exposées à de l'air seul, le groupe traité à un mélange air et 20ppm de monoxyde d'azote, la concentration de NO₂ est maintenue en deçà de 1ppm.

A P5 les animaux sont soumis à une agression excitotoxique via l'injection d'agoniste du glutamate en substance blanche fronto-pariétale droite (Marret et al. 1995). Trois agonistes ont été utilisés, qui activent différents récepteurs du glutamate :

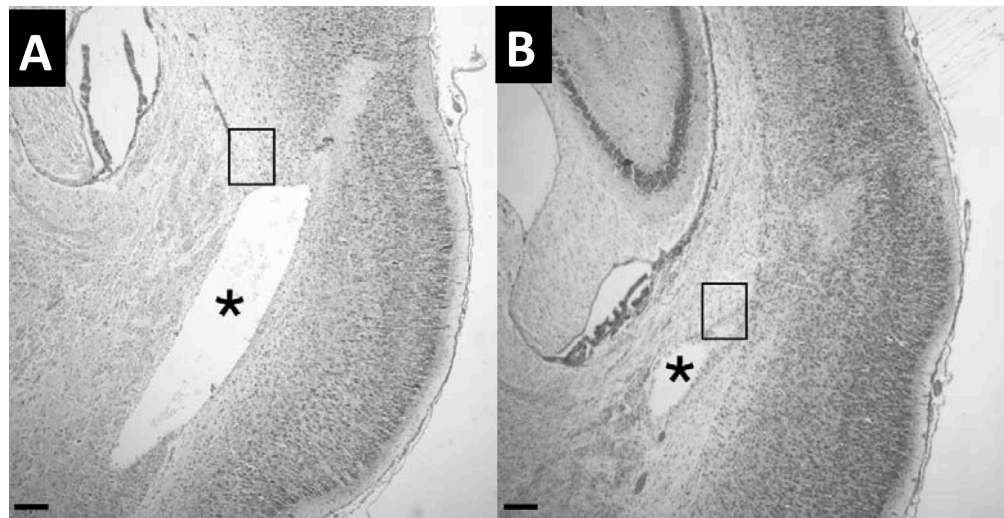
- Iboténate, agoniste des récepteurs NMDA et métabotropiques
- NMDA, spécifique du récepteur NMDA
- S-Willardiine, agoniste des récepteurs AMPA et Kainate.

Cinq jours (P10) et 25 jours (P30) après l'injection excitotoxique, ont été analysées la taille des lésions et les contingents cellulaires de la substance blanche. La taille de la lésion est bien corrélée à son diamètre antéro-postérieur dans un plan sagittal, diamètre que l'on estime au microscope en comptant le nombre de coupes de 16µm successives présentant la lésion kystique. A P1 et P7 ont été analysées par PCR, ELISA et/ou western blot l'expression de la voie VEGF-VEGFR, pAkt- pCreB, et des sous-unités du récepteur au glutamate.

L'inhalation de NO à 20ppm diminue la sensibilité à l'agression excitotoxique.

Tous les animaux, qu'ils soient injectés par l'Iboténate, le NMDA, ou la S-Willardiine, présentent à 5 jours de l'injection une lésion de type cavitaire de la substance blanche, ainsi qu'un remaniement cortical et une destruction de la sous-plaque. Chez les animaux injectés par du PBS, on ne retrouve qu'un défaut parenchymateux sur le trajet de l'aiguille. L'inhalation de 20ppm de NO s'accompagne d'une diminution de 20 à 30 % de la taille des lésions induites par les agonistes Iboténate et NMDA, diminution de la lésion tant en région corticale qu'en substance blanche.

Figure 3.1 : L'exposition prophylactique à 20ppm de No diminue la taille de la lésion créée par l'injection intracérébrale d'iboténate. (A = contrôle, B = iNO 20ppm ; coloration crésyl-violet)



Cependant cet effet n'est pas retrouvé pour une excitotoxicité médiée par la Willardiine, qui agit préférentiellement sur les récepteurs AMPA et Kainate au glutamate. L'inhalation de 5ppm de NO ne montre pas de diminution significative de la taille des lésions, mais un effet-dose se dessine. Enfin cet effet cérébral n'est pas retrouvé si l'exposition au NO débute après l'injection. Cela suggère que :

- soit cet effet du NO est âge-dépendant et dépend d'une exposition entre P1 et P5,
- soit le NO induit une "protection" et non une "réparation".

Diminution de la réaction inflammatoire, pas d'effet sur la lignée oligodendrocytaire.

Nous avons analysé, 5 jours après injection, les différentes populations de la substance par immunohistochimie à l'aide des marqueurs ED-1 (macrophages et microglie activée), GFAP (astrocytes), Olig2 et APC (tous oligodendrocytes et oligodendrocytes matures, respectivement). Nous avons mesuré la densité de ces cellules en substance blanche, au contact de la lésion à sa face dorsomédiane (à proximité de la capsule interne).

Les densités d'astrocytes et de microglie activée sont nettement diminuées au sein de la substance blanche également. Ces deux processus, activation microgliale / invasion macrophagique, et prolifération astrocytaire, sont des marqueurs cellulaires très classiques de l'inflammation cérébrale. Ces résultats témoignent d'une limitation de l'inflammation après exposition au NO à 20ppm.

En revanche l'inhalation de NO ne modifie pas le pool total d'oligodendrocytes (marquage Olig2) ou d'oligodendrocytes matures (marquage APC) à proximité de la lésion de substance blanche, 5 jours après l'injection.

L'inhalation de 20ppm de NO s'accompagne d'une modification d'expression des sous-unités des récepteurs au glutamate.

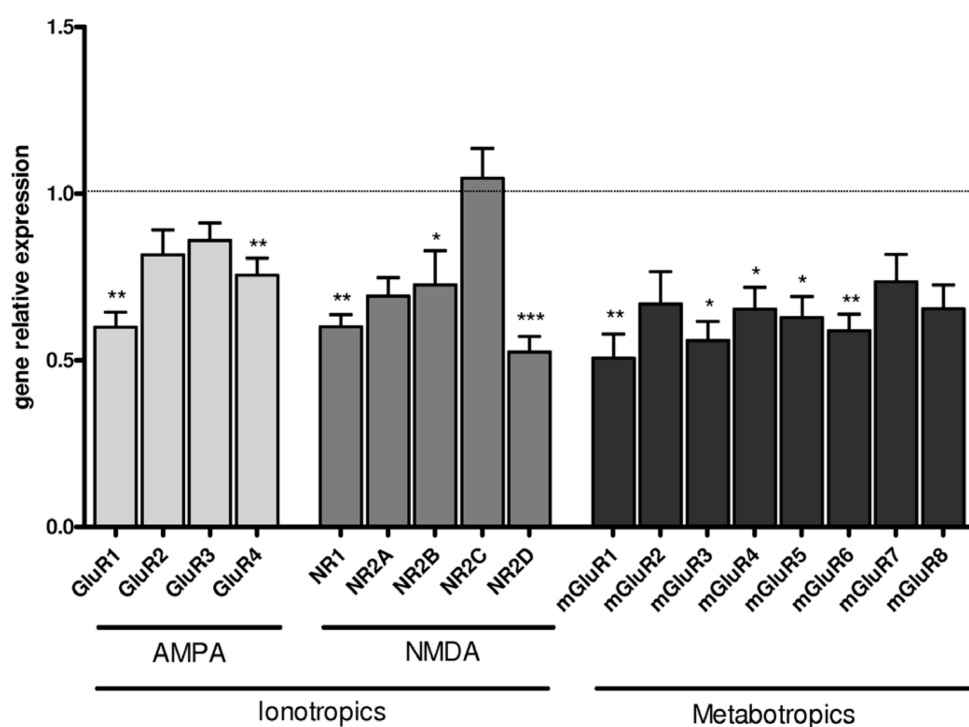
La sensibilité d'une cellule cérébrale au glutamate dépend du nombre de récepteurs NMDA qu'elle présente à sa surface, de leur caractère opérationnel, et de la composition de ces récepteurs (la présence de certaines sous-unités modifie la réponse du récepteur). Il a été démontré dans notre laboratoire que la capacité à réguler des sous-unités du récepteur NMDA modifie la réponse à certaines agressions cérébrales. Chez la souris, la diminution d'expression de la sous-unité NR2B en situation d'hypoxie chronique la protège de lésions de substance blanche. A l'inverse, le raton présente alors des lésions sévères et diffuses de substance blanche (R fontaine pnas 2008).

En PCR quantitative, nous avons analysé l'expression des sous-unités des récepteurs au glutamate. Comparée aux contrôles, l'inhalation de NO à 20ppm s'accompagne à P5, avant l'injection, d'une diminution importante et généralisée de la transcription de ces ARN messagers. Les sous-unités :

- GluR1 et GluR4 du récepteur AMPA/Kainate,
- NR1, NR2B, NR2D du récepteur NMDA,
- et mGluR1, -R3, -R4, -R5, et -R6 des récepteurs métabotropiques

sont 1,5 à 2 fois moins transcrites que chez les contrôles.

Figure 3.2 : Modulation de l'expression des sous-unités des récepteurs au glutamate associée au iNO 20ppm.



Signalisation pAkt/pCREB

Deux arguments nous ont orientés vers une signalisation médiée par CREB. D'une part ce facteur de transcription (cAMP Responsive Element Binding Protein) est un des facteurs identifiés en amont de la cascade NO->Guanylate cyclase->cGMP. En liant un cGMP, pCREB est transloqué au noyau où il agit comme facteur de transcription. D'autre part pCREB intervient dans la régulation de certaines sous-unités de récepteurs au glutamate (NR2B dans le cortex murin).

Nous avons voulu vérifier l'implication de cette signalisation.

A P1, la concentration protéique est significativement diminuée en ELISA, immunohistochimie et western blot chez les animaux exposés au NO. A P7 il n'est pas observé de différence. En amont de pCREB, à P1 les concentrations de protéine Akt et de sa forme phosphorylée sont diminuées dans le groupe NO.

A P7, Akt/pAkt sont très significativement augmentées en western blot.

Nous avons montré que l'inhalation de NO à 20ppm de P1 à P7 réduit significativement la taille de lésion cérébrale d'origine excitotoxique. Ceci est associé à une diminution d'expression de plusieurs sous-unités des récepteurs glutamatergiques à P5. En amont on retrouve une diminution de concentration

protéique Akt/pAkt à P1 ainsi qu'une diminution d'expression et de concentration du facteur de transcription CREB. Nous proposons que le NO inhalé pourrait exercer son activité neuroprotectrice par une régulation de la transcription des sous-unités des récepteurs glutamatergiques via pCREB. Les gènes des sous-unités au glutamate dont l'expression est diminuée dans ce travail portent tous la séquence consensus de liaison à pCREB. C'est un argument supplémentaire dans l'implication de pCREB dans cette régulation NO-dépendante.

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF INHALED NITRIC OXIDE ON
EXCITOTOXIC-INDUCED BRAIN DAMAGE IN NEONATAL RAT.

Julien Pansiot, Gauthier Loron, Paul Olivier, Romain Fontaine, Christiane Charriaut-Marlangue, Jean-Christophe Mercier, Pierre Gressens, Olivier Baud

PLoS ONE

June 2010, Volume 5, Issue 6, e10916

Lien texte intégral :

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0010916>

3 DISCUSSION

Nous avons reproduit chez le rat une problématique clinique : le NO inhalé n'a-t-il que des effets locaux, pulmonaires dans un organisme en développement ? Il nous est apparu que l'inhalation de NO à des doses cliniquement pertinentes de 5 ou 20ppm chez le rat s'accompagnait de modifications histologiques très reproductibles. Dès lors nous avons poursuivi trois directions : caractériser ce phénotype, comprendre la chaîne de transmission des effets du NO, en investiguer le potentiel délétère ou protecteur. Les résultats de ce travail peuvent être résumés en trois actes :

- Une nouvelle preuve du transport du NO : nous avons confirmé que l'inhalation de monoxyde d'azote s'accompagne d'effets à distance, dans notre cas sur le cerveau en développement. Cet effet à distance s'affranchit de la synthèse de NO endogène. L'injection de nitrite reproduit partiellement le phénotype observé chez les animaux inhalant du NO, suggérant que les nitrates/nitrites pourraient être impliqués dans le transport à distance de NO. Mais surtout, c'est le NO lui-même qui semble délivré à la cellule : le relais intracellulaire classique du NO, le GMP cyclique, est activé, et sa présence est confirmée par mesure directe par voltamétrie.
- L'effet « pro-maturatif » du NO : son inhalation influence considérablement le développement cérébral chez le rat. Nous avons démontré une avance de myélinisation et une augmentation de l'angiogenèse. Cette dernière est diffuse et s'affranchit d'une augmentation des VEGF/VEGFR2 qui est à ce jour le principal couple pro-angiogénique connu dans le cerveau en développement. Le NO agit en aval, via une augmentation du cGMP, et une régulation négative de la thrombospondine 1. Cette TSP1 est le principal inhibiteur connu in vivo de la voie proangiogénique VEGF->VEGFR2->NO->sGG->cGMP. Quant à l'effet sur la substance blanche, il s'agit d'une augmentation considérable, jusqu'à 100% et dose dépendante, de la densité de myéline. Elle est accompagnée d'une prolifération et d'une maturation précoce de la lignée oligodendrocytaire. Plusieurs effets transcriptionnels sont associés, notamment l'expression accrue du PDGFR- α et de Sema3F, respectivement impliqués dans la différenciation oligodendrocytaire et le chimiotactisme. Les animaux exposés au NO ne présentent plus de différence de myélinisation à 21 jours de vie et ne présentent pas de modification de leurs aptitudes cognitives à 60 jours de vie.
- Un effet neuroprotecteur : nous avons démontré le potentiel neuroprotecteur de l'inhalation prophylactique de 20ppm de NO face à une agression excitotoxique. Dans différents modèles classiques d'agoniste du glutamate, nous avons montré une diminution des lésions en substances grise et blanche. Cet effet pourrait être expliqué par la

diminution d'expression de plusieurs sous-unités du récepteur au glutamate, via la régulation du facteur de transcription pCREB.

3.1 LIMITES DES MODELES ETUDIES

L'utilisation d'un modèle de rat nouveau-né est une limite évidente à ce travail. Quelle est la pertinence de corrélérer le développement cérébral *post-natal* du rat à celui du prématuré ? Essentiellement la maturation de la substance blanche : la lignée oligodendrocytaire exprime la même séquence de différenciation et les mêmes marqueurs cellulaires. La proportion d'oligodendrocytes immatures ou de forme mature et l'apparition de la myéline permettent des corrélations histologiques. Les marqueurs protéiques, en combinaison unique à chaque stade de maturation, permettent des corrélations immunohistochimiques. De ce point de vue, le rat entre P3 présente un stade de maturation oligodendrocytaire comparable à un prématuré de 23 SA, à P5 environ 28 SA, à P7 36 SA (Back et al. 2007; Dean et al. 2011).

Les modèles de lésion cérébrale confirment cette corrélation : comme chez l'humain, suite à une agression excitotoxique la zone de susceptibilité se déplace avec la maturation cérébrale : maximum des lésions en substance blanche à P5, et en substance grise à P7 (Mesplès et al. 2005).

Comme nous l'avons vu dans les modèles de leucomalacie, une seule agression de nature hypoxique, inflammatoire, excito-toxique, suffit à induire des lésions de leucomalacie chez le rat ou la souris. Souvent chez l'humain, plusieurs agressions, multifactorielles sont associées dans les lésions du cerveau immature. Les modèles expérimentaux utilisent probablement des agressions plus intenses que celles rencontrées en pathologie humaine. Il existe également des variations inter- ou intra espèce dans la susceptibilité aux lésions de substance blanche : la maturation oligodendrocytaire et l'expression des récepteurs au glutamate à la surface des pré-oligodendrocytes varie avec les espèces de rat (Talós et al. 2006). Il a été prouvé par notre équipe que les souris ne présentaient pas la même susceptibilité à l'hypoxie gestationnelle que les rats, en lien avec une régulation différente de la sous-unité NR2B du récepteur au glutamate (Fontaine et al. 2008).

Par ailleurs aucune corrélation rongeur-humain n'a été publiée à ce jour concernant la chronologie de l'angiogenèse cérébrale. Les déterminants moléculaires principaux : la famille VEGF/VEGFR, les angiogénines et angiopoïétines, thrombospondines, molécules de matrice extra-cellulaire... sont cependant les mêmes, ce qui autorise à spéculer que la séquence de l'angiogenèse est comparable chez l'humain.

Enfin les modèles rongeurs sont des candidats très imparfaits pour l'étude de la substance grise. La limite la plus visible est l'absence de giration chez les rongeurs, mais également l'organisation différente de la sous-plaque (Molnár et

al. 2010). Nous n'avons pas dans ce travail détaillé l'impact du NO sur la migration et la maturation neuronale.

Concernant le métabolisme du NO, le système des NOS 1, 2 et 3 est très conservé, autorisant des corrélations rongeur-humain. Il existe plus de réserves sur les mécanismes impliqués dans le transport du NO. La séquence et la structure de l'hémoglobine varient en fonction des espèces, ce qui pourrait affecter son rôle dans le métabolisme du NO. Par ailleurs les cibles des réactions de S-Nitrosylation sont encore largement méconnues et pourraient varier en fonction des espèces.

3.2 UNE PREUVE ORIGINALE DU TRANSPORT DU NO

Dans les travaux qui ont mené à la découverte du NO en physiologie vasculaire, l'hémoglobine était utilisée comme un inhibiteur des effets de l'EDRF. Ce qui a contribué au dogme que le NO avait une demi-vie négligeable dans la circulation sanguine, et un catabolisme irréversible au contact de l'hémoglobine. Dans l'esprit des cliniciens à dose clinique le NO inhalé est un traitement topique, idée « d'innocuité » renforcée par l'aval de la FDA pour le traitement du nouveau-né, en 1999.

Pourtant on avait observé des effets à distance en pratique clinique : hypotension après inhalation de 80ppm de NO, augmentation de la diurèse, augmentation du temps de saignement. Chez le mouton, l'inhalation de NO à 80ppm induit dans le plasma et le LCR une augmentation du taux de nitrites, mais aussi de cGMP (Conahey et al. 2008).

En 1992 Stamler décrit l'activité biologique de protéines modifiées par S-Nitrosylation (Stamler, Singel, et al. 1992b). Depuis deux voies métaboliques ont été caractérisées, et souvent opposées :

- la genèse de NO par activité de nitrate réductase (exercée entre autres par l'hémoglobine) ;
- la S-Nitrosylation, d'abord de l'hémoglobine, ensuite d'autres protéines, qui pourraient in fine restaurer du NO en bout de chaîne ou avoir une activité biologique propre.

Notre travail apporte une nouvelle preuve de ce transport du NO, mais d'une manière originale : nous avons associé à l'inhalation de NO un phénotype immuno-histochimique et des effets transcriptionnels. Ce phénotype survient après une exposition prolongée, 7 jours, au monoxyde d'azote. Jusqu'alors, les travaux sur le métabolisme endovasculaire du NO se sont focalisés sur la vasodilatation hypoxique. Cette dernière est un phénomène transitoire et qui repose sur une détection directe du NO ou de ses dérivés à court terme. Cette approche basée sur des phénomènes fugaces et dans un environnement très

riche en interactions (hémoglobine-érythrocyte-plasma) n'a pas permis à ce jour de mesurer les implications respectives de la voie des nitrites ou de la S-nitrosylation. Nous pensons que le modèle d'exposition prolongée/expression d'un phénotype pourrait permettre de mieux appréhender les déterminants du transport du NO : En pratique, il s'agirait de vérifier l'absence du phénotype sus-décrit en présence d'inhibiteur d'une voie donnée, ou l'augmentation du phénotype en présence d'agoniste, pour démontrer le caractère nécessaire et suffisant d'une voie de transport du NO.

Nous avons observé une augmentation nette de la concentration de nitrite et nitrate (NOx) dans le plasma des animaux inhalant du NO, à plus de deux fois les taux observés chez les contrôles. M.A. Posencheg rapporte une augmentation similaire de 2,3 fois la normale, chez le prématuré humain inhalant 20ppm de NO (Posencheg et al. 2009). Quelle est la participation des NOx dans le transport du NO ? Nous avons titré par pharmacocinétique la dose nécessaire pour reproduire les taux sériques de NOx sous iNO. L'injection intrapéritonéale de 40mg/kg de nitrate de potassium reproduit une concentration sérique de NOx (400µM 8h après injection) similaire à celle observée chez nos rats exposés au NO depuis 24h. Injecté à cette dose trois fois par jour pendant 7 jours, le nitrate de potassium a partiellement (50%) reproduit l'effet proangiogénique et pro-myélinisant observé avec le iNO. Le caractère partiel de cet effet peut s'expliquer par une concentration sérique insuffisante, ou l'implication d'une autre voie de transport dans notre modèle iNO. Malheureusement nous n'avons pas encore étudié l'implication de la S-nitrosohémoglobine et des S-nitroso-protéines sériques dans notre modèle. Notre tentative de collaboration avec l'équipe de A. Blood pour doser ces dérivés S-nitrosylés n'a pas abouti car leurs outils méthodologiques, développés pour l'agneau, n'étaient pas opérationnels dans l'espèce que nous étudions (Conahey et al. 2008). L'étape suivante serait d'injecter de P1 à P7 chez nos rats une protéine S-nitrosylée, au mieux de la S-nitrosohémoglobine, et d'analyser l'angiogenèse et la myélinisation cérébrale.

Quoi qu'il en soit, cette étude de l'implication des nitrites ne nous permet pas de conclure au caractère « nécessaire » et encore moins « suffisant » de la voie des nitrites dans le transport de NO. Néanmoins nous illustrons les propriétés de cette molécule comme une alternative potentielle au monoxyde d'azote.

Si nous n'avons pas élucidé le mécanisme du transport du NO, nous avons cependant plusieurs preuves pour penser qu'en bout de chaîne c'est bien le radical NO qui déclenche les effets transcriptionnels.

Tout d'abord, les relais intracellulaires classiques du NO sont activés dans le parenchyme cérébral de nos rats : la cGMP est trouvée très augmentée dans le parenchyme cérébral, la thrombospondine est négativement régulée. Ce sont des relais connus au NO (Ridnour et al. 2005; Isenberg, Martin-Manso, et al. 2009a), et un argument indirect de la présence de NO. Notre deuxième argument indirect est que l'inhalation de NO corrige les effets d'un blocage

pharmacologique des NOS par le L-Name. Le iNO corrige le retard staturo-pondéral et le retard de myélinisation observés en cas de blocage des NOS.

Il est beaucoup plus difficile de détecter directement le NO in vivo, surtout de manière peu invasive. Sa demi-vie est extrêmement courte, c'est un composé très réactif, et la plupart des méthodes utilisent des réactions d'oxydoréduction qui ne permettent pas toujours de différencier le NO des radicaux libres qui en dérivent, des nitrites/nitrate, voire des protéines S-nitrosylées (McQuade & Lippard 2010). Parmi les méthodes directes, la technique de spectrométrie EPR (Electron Paramagnetic Resonance) est utilisable sur tranche (Ghazi et al. 2012). Elle détecte la liaison du NO à des complexes métalliques, mais nécessite un équipement de spectrométrie, la sensibilité et la résolution spatiale sont médiocres, et le nitrite peut passer pour du NO dans cette méthode (Bohlen und Halbach 2003). Cette technique est adaptée à la recherche du NO sur tranche. La méthode chemoluminescente repose sur l'interaction du NO avec le luminol et le peroxyde d'hydrogène, ce qui génère des photons (Bohlen und Halbach 2003). Il s'agit d'une détection quasi-indirecte et le métabolisme des radicaux libres peut largement interférer avec cette réaction. Nous avons utilisé, en collaboration avec le Dr Gharib à Lyon, une méthode ampérométrique, avec une électrode en carbone. Cette méthode est sensible, fiable, invasive. Parmi les limites, l'introduction de l'électrode dans le parenchyme peut induire une réaction inflammatoire et l'activation des NOS. Nous avons montré dans notre groupe une augmentation du NO intracérébral au cours de l'inhalation de NO à 20ppm (Charriaut-Marlangue et al. 2012), y compris dans le cas où les NOS sont inhibées par le L-Name.

En résumé l'inhalation de NO est associée :

- A des modifications histologiques et transcriptionnelles dans le cerveau en développement ;
- A l'irruption de monoxyde d'azote dans les cellules cérébrales, concomitamment à l'inhalation et indépendamment des NOS.

C'est la preuve d'un transport réversible du monoxyde d'azote inhalé. Il est probable que les NOx ET les S-Nitroso protéines participent au transport du NO. La seule voie du nitrate et de la nitrate réductase de l'hémoglobine n'est probablement pas suffisante. Le NO produit par la nitrate réductase d'une molécule d'hémoglobine, au sein d'un érythrocyte, a bien plus de chance de réagir avec les hèmes des nombreuses molécules d'hémoglobine environnantes que de rejoindre par diffusion passive la guanylate cyclase cytoplasmique d'une cellule à quelques microns de là. Le groupe de Stamler a démontré que les S-nitrosothiols de bas poids moléculaire pourraient préserver l'activité biologique du NO dans le sérum (Hess et al. 2005) (Hess et al. 2005). Autrement dit, nous spéculons, si la voie du nitrate est impliquée, que :

- Le NO produit par l'hémoglobine réductase est exporté jusqu'à la cellule par des S-nitrosothiols, qui restitueront du NO à proximité de la cible intracellulaire (Gladwin et al. 2006);

- Ou que l'activité de nitrate réductase n'est pas exercée par l'hémoglobine mais par une autre enzyme, à proximité de la sGC intracellulaire. Mais nous ne connaissons pas de mécanisme d'import de nitrate dans la cellule.

3.3 MECANISMES DES EFFETS DU NO SUR CERVEAU SAIN OU LESE

Ce modèle d'inhalation NO - incluant les travaux de Hoa Pham récemment publiés (Pham et al. 2012) - et le travail du groupe de T. Inder chez le babouin prématuré (Rees et al. 2007) sont les seuls à s'intéresser à des effets cellulaires à distance. Jusqu'ici seul l'effet hémodynamique vasodilatateur du NO était étudié, y compris dans les travaux de neuroprotection par iNO, qui s'intéressent à l'impact du NO sur le débit artériolaire et/ou capillaire (Terpolilli, Kim, et al. 2012a; Charriaut-Marlangue et al. 2012). Pour Rees, dans un modèle de babouin prématuré ventilé mécaniquement, l'inhalation prophylactique de NO à 5ppm pendant 14 jours s'accompagne d'hémorragie sous-arachnoïdienne dans 25% des cas et d'une augmentation de la densité astrocytaire en substance blanche (Rees et al. 2007).

Chez le raton nouveau-né, l'inhalation de NO s'accompagne

- d'une augmentation diffuse de la densité vasculaire (+50%) dans le cortex cingulaire, la substance blanche cingulaire, le striatum, à P14. Nous observons une augmentation du nombre de capillaires marqués par champ, mais également une augmentation du nombre d'intersections entre les capillaires et la grille utilisée pour le comptage. Cela témoigne indirectement d'une augmentation de la longueur et de la ramification des vaisseaux.
- D'une augmentation de la densité de myéline à P7, documentée en immunohistochimie, microscopie électronique, et une augmentation du pool d'oligodendrocytes et des formes matures d'oligodendrocytes.

A 21 jours de vie, nous n'observons plus de différence entre les groupes. Les effets pro-myélinisants et pro-angiogéniques sont transitoires et correspondent à une avance de maturation. Quels en sont les mécanismes ?

3.3.1 EFFET TRANSCRIPTIONNEL A DISTANCE DU INO.

Notre principale hypothèse est qu'il s'agit d'un effet transcriptionnel. Nous avons montré que le NO exogène active le même relais que le NO endogène, sans impliquer la voie VEGF ou les NOS. A P1 la concentration sérique du VEGF-A diminue sans l'être significativement, tout comme l'expression de VEGFR1, et la concentration protéique de VEGFR2 à P7 en western blot. Ce qui peut

s'interpréter comme une régulation négative de la voie VEGF/VEGFR et une preuve supplémentaire et indirecte que le NO exogène agit en aval du VEGFR, comme le NO endogène. Plusieurs gènes voient leur expression modifiée : la thrombospondine 1, le PDGFR α , Sema3F, pCREB, et certaines sous-unités des récepteurs AMPA, NMDA, et métabotropiques au glutamate. Nous n'avons pas *stricto sensu* démontré la causalité entre l'exposition au NO et les effets transcriptionnels, mais ce lien de causalité est plausible et probable. Le NO est un second messenger, et une régulation de la transcription est le dénominateur commun le plus rationnel aux nombreux effets observés dans notre modèle. Hemish a illustré ces larges effets transcriptionnels après activation de iNOS sur des fibroblastes in vitro, en utilisant des puces-microarray (Hemish 2003). Sont exprimés de nombreux gènes du métabolisme, de l'inflammation, de la signalisation cellulaire, de protéines de transcription et traduction, par quatre voies de transcription : NF- κ B, PI3K, PKC, p53. L'implication du NO est documentée dans la régulation transcriptionnelle de la synaptogénèse (Risher & Eroglu 2012), la migration neuronale (Tegenge et al. 2010), l'angiogenèse cérébrale (Lee et al. 2009; Bornstein 2009).

Cependant nous n'avons documenté la régulation que de quelques gènes, quand on pourrait attendre une activation plus large de la transcription. Une étude sur puce-micro-array dans notre modèle documenterait l'étendue de ces effets transcriptionnels. Nous avons recherché des modifications d'expression à P7 de plusieurs autres gènes activés dans la différenciation ou la prolifération, l'angiogenèse, sans montrer d'autres effets significatifs sur l'expression de ces molécules-clé dans le développement cérébral (brn2, Tie2, Krox20, sox10, sema3a, Nkx2.2, c-jun, Angiogénine1, Angiopoïétine).

3.3.1.1 Effet transcriptionnel du NO : voie NO -> cGMP -> CREB

La relation entre sensibilité à une agression excito-toxique et l'expression des sous-unités des récepteurs au glutamate est reconnue (Fontaine et al. 2008; Degos et al. 2008; Farinelli et al. 2012; M. Chen et al. 2008; Y. Liu et al. 2007) .

La littérature confirme :

- que le facteur de transcription CREB intervient dans l'expression des récepteurs au glutamate
- et que la signalisation par le NO intervient dans la régulation de CREB.

On prête au facteur de transcription CREB de nombreuses fonctions dans le neurone : survie et différenciation, synaptogénèse, expression du BDNF, de Bcl2 (Kitagawa 2007; CarlezonJR et al. 2005). La séquence CRE (cAMP Response Element) sur laquelle se fixe pCREB est retrouvée en amont de certains gènes des récepteurs au glutamate (ceux dont la baisse est associée à l'inhalation de NO). D'autres équipes ont documenté l'implication de CREB dans la régulation des récepteurs au glutamate (Kitagawa 2007; Rani 2005; Lonze et al. 2002; Lonze & Ginty 2002; Lau et al. 2004). CREB peut recevoir une phosphorylation

sur sa Sérine 133 ; cette phosphorylation activerait la liaison de CREB à l'ADN (Contestabile 2008). Le monoxyde d'azote participerait à cette phosphorylation selon la voie Calmoduline Kinase->NOS->NO->cGMP->PKG (Lu & Hawkins 2002). Enfin, des protéines associées à CREB pourraient être activées par S-Nitrosylation (Riccio et al. 2006).

3.3.1.2 Une voie NO -> PDGFR α et Sema-3F ?

L'expression du PDGFR α est classiquement associée à la différenciation oligodendrocytaire (Collarini et al. 1991). Les sémaphorines bénéficient d'une littérature abondante comme facteurs chimiotactiques, impliqués dans la croissance axonale et la prolifération dendritique (Van Vactor & Lorenz 1999; Howell & Shen 2011; Shelly et al. 2011). Les sémaphorines 3A et 3F semblent également impliquées dans le chimiotactisme des oligodendrocytes immatures et myélinisants (Williams et al. 2007).

Il n'existe pas dans la littérature de preuve d'une régulation de PDGFR α ou de Sema-3F par le NO, qui viendrait corroborer nos observations et hypothèses pour cette voie de signalisation. Cependant dans la cellule mésangiale de rat, Beck et Güder ont décrit l'induction de PDGFR α par le NO (Beck 2005).

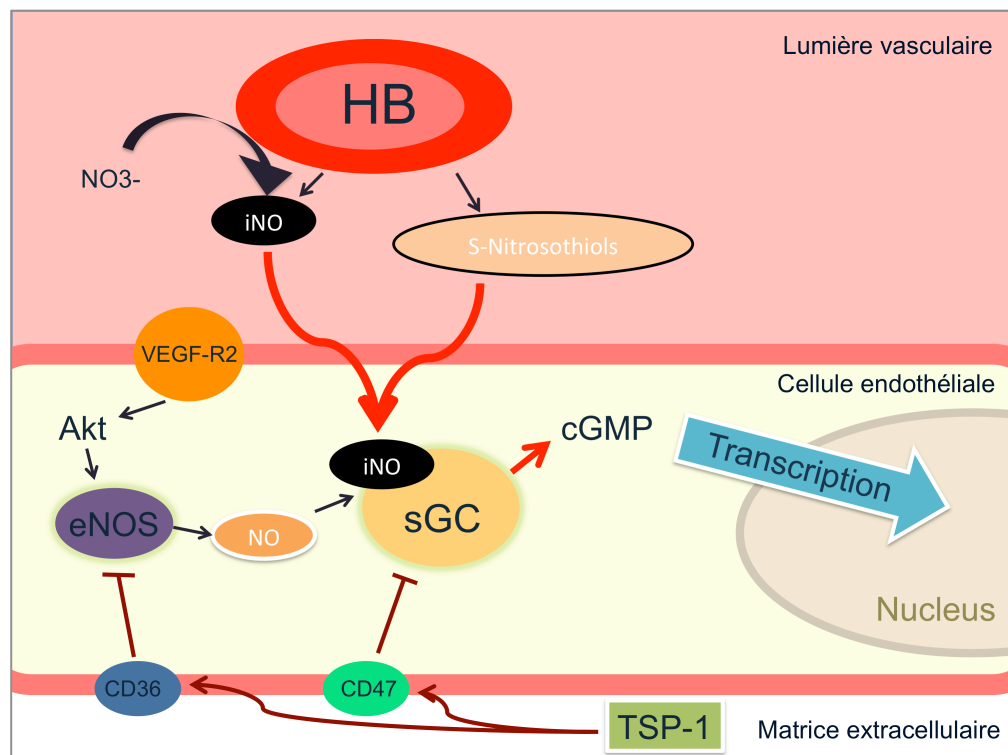
3.3.1.3 Interaction Thrombospondine-1 / Signalisation par le NO

L'inhalation de NO s'accompagne d'une diminution d'expression du gène de la thrombospondine 1. Cette protéine antiangiogénique fait l'objet d'une littérature abondante, dans le domaine de la cancérologie en particulier. TSP-1 est une glycoprotéine sécrétée dans le milieu extracellulaire. Elle se lie aux récepteurs membranaires CD36 et CD 47. Via CD36, elle inhibe la NO synthase et la relargage d'acide myristique. Via CD47 elle inhibe la guanylate cyclase soluble et la cGKI (Protéine kinase liant cGMP) (Murphy-Ullrich & Iozzo 2012; Isenberg, Shiva, et al. 2009b; Isenberg et al. 2007). Elle est un régulateur de l'angiogenèse (Bornstein 2009; D. D. Roberts et al. 2007). La littérature récente promeut la thrombospondine-1 comme rôle d'un régulateur endogène et ubiquitaire de la signalisation NOS->NO->cGMP (D. D. Roberts et al. 2012; Isenberg, Martin-Manso, et al. 2009a). Son implication a été récemment rapportée dans la synaptogénèse NO-dépendante (Risher & Eroglu 2012).

Au vu de cette littérature, et de la régulation négative de l'expression de TSP1 dans notre modèle, nous avons utilisé un agoniste de la thrombospondine développé par le laboratoire Abbott en cancérologie comme anti-angiogénique : ABT-510 (Anderson et al. 2007; Hasina et al. 2009; Nabors et al. 2010; Baker et al. 2008). La dose utilisée a été déterminée par des essais précliniques d'inhibition de l'angiogenèse (Campbell et al. 2010). En injectant cet ABT-510 nous souhaitons exacerber l'inhibition de la Thrombospondine-1 sur les CD36 et CD47 et sur la signalisation cGMP dépendante. Cette manipulation confirme l'implication de la voie sGC-cGMP dans les effets pro-angiogéniques et pro-myélinisants du NO inhalé.

En résumé dans les trois mécanismes que nous venons de décrire (expression des récepteurs au glutamate, angiogenèse, maturation oligodendrocytaire et myélinisation) le NO endogène est déjà décrit comme - ou pourrait être - un second messenger physiologique (Figure 10). Dans notre modèle d'exposition prolongée, nous pensons que le NO inhalé est transporté de manière réversible dans la circulation sanguine et délivré sous forme de NO à la cellule. Il pourrait se substituer au NO endogène et amplifier les voies de signalisation NO-sGC-cGMP. A l'âge particulier de notre modèle la sur-stimulation de la signalisation par le NO conduirait à l'amplification de phénomènes transcriptionnels et à un effet pro-maturatif.

Figure 3.1 : Hypothèse d'une signalisation par le iNO : Intégration de nos résultats. Transport du iNO via l'hémoglobine (S-nitrosohémoglobine ?) ou S-nitrosothiols ou Nitrites. *In fine* du NO est délivré à la cellule. Ce NO exogène active les même relais que le NO endogène, et amplifie la signalisation et les effets transcriptionnels liés à cGMP. La TSP1 via les récepteur CD47 est un antagoniste de la signalisation par le sGC.



3.3.1.4 Interaction angiogenèse et maturation oligodendrocytaire, neuroprotection

L'hypothèse que la signalisation iNO -> cGMP induit quelques régulations transcriptionnelles distinctes doit être complétée et approfondie. Il existe un nombre croissant de publications pointant les relations étroites entre

l'angiogenèse, la myélinisation et la neuroprotection. Certains facteurs de croissance ont des rôles beaucoup plus ubiquitaires qu'initialement suggéré et pourraient jouer le rôle de chaînon entre les différents phénomènes que nous avons observés. Nous parlerons ici surtout des propriétés de VEGF et de l'EPO.

Il existe des similitudes dans le mécanisme de croissance axonale et l'angiogenèse. Plus encore, les deux processus partagent un certain nombre de molécules. Ainsi les familles des Ephrines, Netrines, Semaphorines sont impliquées dans la croissance axonale mais aussi dans l'angiogenèse (Nowacka & Obuchowicz 2012; Tam & Watts 2010; Lee et al. 2009; Arese et al. 2011). Inversement plusieurs molécules pro-angiogéniques sont impliquées dans la croissance axonale, comme nous l'avons abordé en introduction (chapitre 1.2.3).

Le rôle de VEGF semble porter au delà de la croissance axonale, sur la maturation de la substance blanche. Nous avons montré que l'inhibition de son récepteur VEGFR2 induit un défaut sévère de myélinisation. Par ailleurs les pré-oligodendrocytes expriment VEGFR2 (Hayakawa et al. 2011). VEGF-A intervient dans la migration des progéniteurs oligodendrocytaires, mais ne semble pas intervenir dans leur prolifération in vitro (Hayakawa et al. 2012). Cela ne recoupe pas complètement le phénotype que nous observons. Par ailleurs la littérature ne fait pas mention d'interaction VEGF-PDGFR α ou de régulation d'expression de Sema3F par le VEGF-A. Il serait intéressant d'étudier dans notre modèle l'effet d'agoniste VEGFR2 sur la myélinisation.

L'érythropoïétine (EPO) associe des effets pro-angiogéniques, pro-myélinisants, et neuroprotecteurs. Nous n'avons pas encore étudié son expression sous iNO, une augmentation de son expression offrirait une explication uniciste aux effets du iNO.

Le récepteur de l'EPO est largement exprimé dans le parenchyme cérébral (Noguchi et al. 2007). L'EPO est impliquée dans le développement cérébral normal : l'inactivation des gènes de l'EPO ou de son récepteur induit des lésions cérébrales importantes (Z.-Y. Chen et al. 2006). L'impact de l'EPO sur la lignée oligodendrocytaire est proche de ce que nous avons observé : augmentation de la prolifération oligodendrocytaire, augmentation des oligodendrocytes matures au pourtour des zones infarctées dans les modèles d'accident vasculaire cérébral (L. Zhang et al. 2010). Il existe une piste sur l'interaction NO-EPO : EPO stimule l'activité de la NOS, et la neuroprotection offerte par l'EPO dans un modèle d'hypoxie in vitro semble NO dépendant. Dans ce modèle le NO induit une augmentation de l'expression du gène de EPO-R (Z.-Y. Chen et al. 2010). Le potentiel neuroprotecteur de l'EPO a été démontré dans des modèles d'hypoxie-ischémie prolongée, de ligature de carotide, d'injection d'agoniste glutamatergique (juul clin perinatol 2004). De nombreux essais cliniques sont en cours en traitement des lésions cérébrales périnatales (clinicaltrial.gov). La pharmacocinétique, l'innocuité et de potentiels bénéfices de l'EPO sont documentés chez l'adulte (Ehrenreich et al. 2002; Xenocostas et al. 2005)

3.3.2 EFFETS NON TRANSCRIPTIONNELS DU NO INHALE ?

Parmi les effets non transcriptionnels du NO inhalés, nous envisageons les hypothèses d'un effet trophique du développement vasculaire sur la myélinisation, l'impact sur la gazométrie et l'oxygénation, la modulation du métabolisme mitochondrial.

Sur les gaz du sang prélevés à P1, P7, P14 nous n'avons pas documenté de modification de l'oxygénation. Un tel effet aurait pu avoir un impact sur le développement cérébral ou la signalisation HIF-1, dont on sait qu'elle interfère avec le NO et l'angiogenèse. A 20ppm, nous retrouvons une diminution significative de la pression artérielle en CO₂ de 48,62 à 41,92mmHg. Enfin la méthémoglobinémie était inférieure à 0,1 à tous les âges à 20ppm.

Le développement vasculaire pourrait avoir un effet trophique sur le parenchyme cérébral, en augmentant la disponibilité d'oxygène, nutriments, hormones de croissance. L'hypothèse est évoquée dans les interactions entre angiogenèse et croissance axonale et dendritique (Mackenzie & Ruhrberg 2012). Dans notre modèle, elle est mise à mal par la chronologie des événements observés : le développement vasculaire est documenté à P14, quand l'effet promyélinisant et neuroprotecteur est détecté vers P7.

Une autre hypothèse est celle d'une modulation du métabolisme mitochondrial. Nous avons vu en introduction que le NO pouvait interférer avec le fonctionnement des complexes I et IV de la chaîne respiratoire. De ce que l'on en connaît actuellement le NO tendrait à inhiber le métabolisme mitochondrial et augmenter la concentration d'oxygène cytoplasmique. Cela pourrait-il avoir l'impact que nous observons sur la maturation ? Ce n'est pas notre hypothèse première. Nous n'avons pas analysé l'effet du iNO sur le métabolisme mitochondrial mais cela pourrait être une extension intéressante à ce travail, surtout si l'on envisage l'utilisation du NO en thérapeutique.

3.4 LE NO COMME MEDICAMENT ?

Nous avons démontré le potentiel neuroprotecteur d'une inhalation prophylactique de 20ppm de NO dans un modèle d'excitotoxicité chez le rongeur, via une régulation des sous-unités des récepteurs au glutamate. L'impact positif sur la myélinisation, la prolifération et la maturation de la lignée oligodendrocytaire constitue un autre potentiel neuroprotecteur. Et au delà du cerveau en développement la stimulation de l'angiogenèse constitue dans certaines pathologies un objectif thérapeutique. Peut-on envisager le NO comme un médicament ? Concernant le poumon, les cliniciens ont déjà franchi le pas et nous avons abordé les essais cliniques en introduction. Nous ne possédons actuellement pas de compréhension suffisante des mécanismes décrits dans ce travail pour transposer sereinement ces résultats au prématuré

humain. Quoi qu'il en soit, des essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer le potentiel neuroprotecteur du NO inhalé chez le prématuré (source ClinicalTrial.gov). Quels sont les pré-requis et les limites envisageables dès à présent à l'utilisation du NO comme pro-angiogénique, promyélinisant, neuroprotecteur ?

3.4.1 L'INHALATION PROLONGEE DE NO N'INDUIT PAS DE LESION SUR LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT CHEZ LE RAT.

Ce travail apporte deux arguments concernant l'innocuité d'une inhalation prolongée de NO chez le rat : absence d'hémorragie, absence d'activation inflammatoire cérébrale.

Aucun des (nombreux) cerveaux prélevés ne présentait d'hémorragie sous arachnoïdienne ou intraventriculaire, que ce soit macroscopiquement ou en microscopie optique. Nous ne retrouvons pas les résultats notés par Rees dans le modèle de babouin inhalant 20ppm de NO. Cette préoccupation est légitime sachant l'allongement du temps de saignement et l'inhibition d'agrégation plaquettaire induits par le iNO (Höglman et al. 1993; Cheung et al. 1998). Dans un des essais cliniques chez le prématuré, Van Meurs avait rapporté une augmentation de l'incidence des hémorragies intraventriculaires de haut grade (Van Meurs et al. 2005). Nous n'avons pas documenté de phénomène hémorragique intracrânien chez le rat sur une grande série de spécimens.

Le radical NO est un acteur de la réaction inflammatoire, et peut contribuer à l'apoptose, selon le contexte cellulaire (cf introduction). Dans nos travaux, l'inhalation prolongée de NO chez le rat n'induit pas de lésion cérébrale, n'entraîne ni apoptose (marquage Tunnel) ni activation microgliale (marquage ED-1) ni prolifération astrocytaire.

3.4.2 LES EFFETS DU iNO SONT-ILS DEPENDANTS D'UN CONTEXTE CELLULAIRE ?

Les effets proangiogénique, promyélinisant, neuroprotecteur, sont-ils extrapolables à tout âge, ou dépendent-ils d'une fenêtre particulière dans le développement ? Nous avons montré que l'inhalation de NO exogène s'accompagne d'une augmentation des taux de cGMP. Cette augmentation de cGMP a-t-elle les mêmes effets à d'autres moments du développement cérébral ? Nos résultats ne nous permettent pas de le préciser. Une transposition de ce travail à un âge différent (rat juvénile ou adulte) pourrait apporter éléments de réponse.

Si les effets « pro-maturatifs » et neuroprotecteurs du iNO n'en demeurent pas moins prometteurs pour le cerveau du prématuré humain. Potentiellement le

iNO en prophylaxie diminuerait la sensibilité à une agression excito-toxique. De plus, en stimulant la différenciation oligodendrocytaire il réduirait la fenêtre de vulnérabilité de la lignée oligodendrocytaire aux agressions (excito-toxiques, oxydatives, inflammatoires...) à condition d'une exposition prophylactique. Le potentiel neuroprotecteur que nous avons décrit nécessite l'exposition préalable au NO. Si le traitement est débuté en période aigue, c'est à dire dans un contexte d'agression inflammatoire, excito-toxique, on s'expose aux effets potentiellement délétères du NO : stress oxydatif et nitrosatif, inhibition du métabolisme mitochondrial, apoptose (Iadecola 1997). Chez le prématuré il est très difficile de connaître le moment exact où la lésion cérébrale se constitue : les agressions sont souvent séquentielles, multifactorielles, débutent in utero, et notre monitoring est insuffisant pour repérer précocement des lésions insidieuses. C'est un des enjeux de la néonatalogie de titrer biologiquement ou par l'imagerie le niveau de stress oxydatif, inflammatoire, au niveau du poumon, de l'intestin, du cerveau, pour anticiper la survenue des principales complications de la prématurité.

Par ailleurs, si dans ce modèle nous le iNO a été utilisé de manière prophylactique, un effet de post-conditionnement n'est pas écarté. Parmi les voies métaboliques du NO endogène, de nombreuses sont impliquées dans le post-conditionnement pharmacologique (Erk ; radicaux libres, modulation du métabolisme mitochondrial, HIF1- α ...). Dans des modèles animaux d'AVC, autres que des modèles de rongeur, le iNO semble efficace en post conditionnement immédiat (Charriaut-Marlangue 2012). Au moment de l'accident vasculaire survient une forte augmentation de NO médiée par iNOS, potentiellement délétère mais brève, suivie d'une diminution sur plusieurs jours qui semble péjorative (Terpolilli, Moskowitz, et al. 2012b). L'activation de la nNOS semble péjorative également. Le NO produit par les eNOS participe à diminuer la taille de la lésion au profit de la zone de pénombre. A un même moment à différents endroits de la lésion le NO pourrait avoir des effets opposés... Les résultats contradictoires des thérapies impliquant le NO illustrent cette complexité (R. Zhang 2003; Kunz et al. 2007). Récemment notre équipe a montré un effet bénéfique de l'inhalation de 20ppm de NO sur la zone de pénombre via la dilatation de collatérales (Charriaut-Marlangue et al. 2012).

Au dehors du cerveau, le iNO pourrait trouver un contexte favorable à des effets pro-myélinisants ou pro-angiogéniques sur des sites lésionnels en cicatrisation. On pense en particulier à la cicatrisation médullaire post-traumatique, au myocarde en post-infarctus, en situation de greffe cutanée.

Au final l'impact du iNO nous semble lié au contexte cellulaire de deux façons. D'une part comme agoniste de la voie cGMP, le iNO n'est pas un spécifique d'une cible et ses effets dépendent des voies de signalisation actives au moment du traitement. La voie des S-nitrosylation est un autre mécanisme d'action du iNO et pourrait avoir des cibles et des effets spécifiques. D'autre part selon la dose de iNO, le contexte redox cellulaire, la pression partielle en oxygène, le contexte inflammatoire, le iNO peut participer et amplifier un stress oxydatif, nitrosatif, et exercer des effets délétères.

4 PERSPECTIVES :

Le iNO a un potentiel pro-angiogénique, pro-myélinisant et neuroprotecteur sur le cerveau en développement chez le rat. Plusieurs pistes de recherche s'offrent à nous.

Tout d'abord dans notre modèle de rat, il faudrait éclaircir les mécanismes du transport du NO. Nous projetons de doser les dérivés S-Nitrosylés plasmatiques après exposition au NO, de caractériser la S-nitrosylation de l'hémoglobine par électrophorèse. Pour juger de la participation de l'hémoglobine dans le métabolisme endovasculaire du NO, nous pouvons quantifier le NO délivré au cerveau chez des animaux anémiés ou avec une carboxyhémoglobinémie importante. Si l'hémoglobine est incontournable dans le métabolisme endovasculaire du NO, le transport de ce dernier pourrait être diminué.

Ensuite préciser la ou les voies intracellulaires du iNO. Le caractère obligatoire de la signalisation cGMP pourrait être confirmée par un inhibiteur spécifique et irréversible de la sGC comme l'ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) en quantifiant l'impact de cette inhibition sur la transcription de PDGFR α , TSP1... Par ailleurs nous souhaitons rechercher l'existence d'une signalisation par S-nitrosylation intracellulaire (Borderie & Ekindjian 2008). Pour ces travaux, l'étude in vitro sur culture cellulaire ou sur tranche nous semble plus adaptée.

Le potentiel neuroprotecteur du iNO fait déjà l'objet d'un essai clinique. Toutefois notre compréhension de son mécanisme d'action ne nous semble encore limitée pour l'envisager chez le prématuré humain et sélectionner la meilleure population. Nous projetons d'exposer au iNO des rats plus âgés, et de tester le potentiel neuroprotecteur sur d'autres modèles animaux de lésions cérébrales périnatales. H. Pham dans notre équipe a confirmé le potentiel neuroprotecteur du NO dans un modèle d'hypoxie gestationnelle/hyperoxie post natale (Pham et al. 2012). Par ailleurs les résultats contradictoires obtenus chez le babouin nous incitent à reproduire notre modèle chez un primate. Ce serait également le modèle idéal pour étudier l'impact du iNO sur la neurogenèse et synaptogenèse.

Ceci dit, l'objectif final est de tester le potentiel neuroprotecteur chez le prématuré humain. Les essais cliniques passés et en cours corréler l'inhalation de NO avec l'objectif primaire du développement neurologique à long terme (2 ans). Cet objectif primaire classique est peu spécifique et nécessite un fort effectif. Un essai clinique randomisé reposant sur un objectif primaire d'imagerie (vitesse de myélinisation / survenue de lésions à l'IRM, ou un critère combiné mêlant échographie transfontannellaire et IRM) nous semble une alternative intéressante : probablement moins coûteux, nécessitant moins d'enfants, et dessiné pour rechercher les effets trouvés in vitro. L'IRM réalisée à terme est reconnue pour bien corréler avec le développement neurologique à moyen terme (de Vries et al. 2011; Inder et al. 2005). L'analyse de la

microstructure cérébrale est maintenant accessible in vivo à l'aide des séquences de tractographie par tenseur de diffusion. Ce type de séquence nous semble très prometteuse dans ce type de translation de thérapeutique neuroprotectrice. Dans le cas du iNO, il s'agirait de vérifier la normalité de la mise en place des faisceaux au sein de la substance blanche, et de comparer leur précocité d'installation avec les prématurés n'inhalant pas de iNO.

Les autres champs d'application chez l'homme pourraient-être, on l'a vu, l'AVC, et plus largement les processus de cicatrisation : médullaire, myocardique, greffe cutanée, hépatique (Pepine 2009; Ben Abdennebi et al. 2011; Afraz et al. 2012)...

Enfin, si la voie du NO est probablement une piste de neuroprotection prometteuse, le NO lui-même n'est peut-être pas le candidat idéal. Il est très dépendant du contexte oxydatif et inflammatoire, et non spécifique. S'il est administré concomitamment à un processus oxydatif, inflammatoire, ce sont les effets délétères du radical NO qui pourraient s'exprimer : production de radicaux inflammatoires, effet pro-apoptotique, etc. Au vu des résultats controversés chez le poumon, on peut redouter un destin similaire au iNO sur le cerveau humain, à défaut de connaître la fenêtre d'action optimale et de sélectionner convenablement les enfants. Parmi les molécules agissant sur la voie du NO, nous souhaitons étudier trois candidats actuellement très prometteurs : les nitrites, l'inhalation d'éthylnitrite, et les inhibiteurs de phosphodiésthérases dont le sildénafil. Ce dernier est un inhibiteur spécifique de la phosphodiésthérase-5, et contribue, comme le iNO, à augmenter la concentration intracellulaire de cGMP. Dans des modèles de stroke chez le rat fœtal, néonatal, adulte, le sildénafil a montré de prometteuses propriétés neuroprotectrices, même administré après l'agression : augmentation de l'angiogénèse, de la neurogénèse et du remodelage axonal, diminution de la perte de substance périventriculaire (R. Zhang 2002; Ferreira 2012; Ozdegirmenci 2011). Le sildénafil a sur le iNO l'avantage de n'agir que sur les concentrations de cGMP, sans dualité dans ses effets. Nous étudions actuellement les effets du sildénafil dans un modèle de cerveau en développement, avec des résultats préliminaires très encourageants.

5 ANNEXES

Ciprofloxacin prevents myelination delay in neonatal rats subjected to E. coli sepsis.

Loron G, Olivier P, See H, Le Saché N, Angulo L, Biran V, Brunel N, Besson-Lescure B, Kitzis MD, Pansiot J, Bingen E, Gressens P, Bonacorsi S, Baud O.
Ann Neurol. 2011 Feb;69(2):341-51

Neuroprotective strategies for the neonatal brain

V Degos, G Loron, J. Mantz, P. Gressens,
Anesthesia Analgesia, 2008 Jun;106(6):1670-80. Review.

Impact of Inhaled NO on developing lung and brain.

Baud O, Olivier P, Vottier G, Pham H, Mercier JC, Loron G.
Arch Pediatr. 2009 sep;16 Suppl 1:S1-8. French.

Inhaled nitric oxide to prevent bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates

Mercier JC, Olivier P, Loron G, Fontaine R, Maury L, Baud O.
Semin Fetal Neonatal Med. 2009 Feb;14 (1):28-34. Epub 2008 Nov 5

Melatonin Promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats.

Olivier P, Fontaine RH, Loron G, Van Steenwinckel J, Biran V, Massoneau V, Kaindl A, Dalous J, Charriaut-Marlangue C, Aigrot MS, Pansiot J, Verney C, Gressens P, Baud O.
PLoS One. 2009 Sep 22;4(9):e7128

IL-9/IL-9 receptor signalling selectively protects cortical neurons against developmental apoptosis

Fontaine RH, Cases O, Lelièvre V, Mesplès B, Renaud JC, Loron G, Degos V, Dournaud P, Baud O, Gressens P.
Cell Death Differentiation, 2008 oct; 15(10):1542-52

Ciprofloxacin prevents myelination delay in neonatal rats subjected to E. coli sepsis.

Loron G, Olivier P, See H, Le Saché N, Angulo L, Biran V, Brunel N, Besson-Lescure B, Kitzis MD, Pansiot J, Bingen E, Gressens P, Bonacorsi S, Baud O. Ann Neurol. 2011 Feb;69(2):341-51

Lien texte intégral :

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.22190/abstract;jsessionid=9F2929DEF6F5E610AB8C04D8843E0CF1.d04t01>

Neuroprotective strategies for the neonatal brain

V Degos, G Loron, J. Mantz, P. Gressens,
Anesthesia Analgesia, 2008 Jun;106(6):1670-80. Review.

Lien texte intégral :

<http://www.anesthesia-analgesia.org/content/106/6/1670.long>

Impact of Inhaled NO on developing lung and brain.

Baud O, Olivier P, Vottier G, Pham H, Mercier JC, Loron G.
Arch Pediatr. 2009 sep;16 Suppl 1:S1-8. French.

Lien texte intégral :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929693X09752959>

Inhaled nitric oxide to prevent bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates

Mercier JC, Olivier P, Loron G, Fontaine R, Maury L, Baud O.

Semin Fetal Neonatal Med. 2009 Feb;14 (1):28-34. Epub 2008 Nov 5

Lien texte intégral

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744165X0800108X>

Melatonin Promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats.

Olivier P, Fontaine RH, Loron G, Van Steenwinckel J, Biran V, Massoneau V, Kaindl A, Dalous J, Charriaut-Marlangue C, Aigrot MS, Pansiot J, Verney C, Gressens P, Baud O.

PLoS One. 2009 Sep 22;4(9):e7128

Lien texte intégral

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007128>

IL-9/IL-9 receptor signalling selectively protects cortical neurons against developmental apoptosis

Fontaine RH, Cases O, Lelièvre V, Mesplès B, Renault JC, Loron G, Degos V, Dournaud P, Baud O, Gressens P.

Cell Death Differentiation, 2008 oct; 15(10):1542-52

Lien texte intégral

<http://www.nature.com/cdd/journal/v15/n10/full/cdd200879a.html>

6 BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Abello, N. et al., 2009. Protein Tyrosine Nitration: Selectivity, Physicochemical and Biological Consequences, Denitration, and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins. *Journal of Proteome Research*, 8(7), pp.3222–3238.
- Abernethy, L.J., Cooke, R.W.I. & Foulder-Hughes, L., 2004. Caudate and hippocampal volumes, intelligence, and motor impairment in 7-year-old children who were born preterm. *Pediatric research*, 55(5), pp.884–893.
- Abman, S.H. & Kinsella, J.P., 1995. Inhaled nitric oxide for persistent pulmonary hypertension of the newborn: the physiology matters! *PEDIATRICS*, 96(6), pp.1153–1155.
- Afraz, S. et al., 2012. Protective effect of pharmacologic preconditioning with pioglitazone on random-pattern skin flap in rat is mediated by nitric oxide system. *The Journal of surgical research*, 176(2), pp.696–700.
- Allen, B.W., Stamler, J.S. & Piantadosi, C.A., 2009. Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation. *Trends in molecular medicine*, 15(10), pp.452–460.
- Anderson, J.C. et al., 2007. ABT-510, a modified type 1 repeat peptide of thrombospondin, inhibits malignant glioma growth in vivo by inhibiting angiogenesis. *Cancer biology & therapy*, 6(3), pp.454–462.
- Arese, M., Serini, G. & Bussolino, F., 2011. Nervous vascular parallels: axon guidance and beyond. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(4-5), pp.439–445.
- Arnold, W.P. et al., 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(8), pp.3203–3207.
- Askie, L.M. et al., 2010. Inhaled nitric oxide in preterm infants: a systematic review and individual patient data meta-analysis. *BMC pediatrics*, 10, p.15.
- Autiero, M. et al., 2005. Role of neural guidance signals in blood vessel navigation. *Cardiovascular Research*, 65(3), pp.629–638.

-B-

- Back, S.A., 2006. Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 12(2), pp.129–140.
- Back, S.A. et al., 1998. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes

- to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(16), pp.6241–6253.
- Back, S.A. et al., 2005. Selective vulnerability of preterm white matter to oxidative damage defined by F2-isoprostanes. *Annals of neurology*, 58(1), pp.108–120.
- Back, S.A., Riddle, A. & McClure, M.M., 2007. Maturation-Dependent Vulnerability of Perinatal White Matter in Premature Birth. *Stroke*, 38(2), pp.724–730.
- Baker, L.H. et al., 2008. Randomized, phase II study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor ABT-510 in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26(34), pp.5583–5588.
- Balasubramaniam, V. et al., 2006. Inhaled NO restores lung structure in eNOS-deficient mice recovering from neonatal hypoxia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 291(1), pp.L119–27.
- Balasubramaniam, V. et al., 2003. Mild hypoxia impairs alveolarization in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 284(6), pp.L964–71.
- Ballard, R.A. et al., 2006. Inhaled nitric oxide in preterm infants undergoing mechanical ventilation. *New England Journal of Medicine*, 355(4), pp.343–353.
- Barbosa, R.M. et al., 2008. *Methods in Enzymology*, Elsevier.
- Barrington, K.J. & Finer, N.N., 2007. Inhaled Nitric Oxide for Preterm Infants: A Systematic Review. *PEDIATRICS*, 120(5), pp.1088–1099.
- Baud, O. et al., 2009. [Impact of inhaled NO on developing lung and brain]. *Archives de pédiatrie : organe officiel de la Société française de pédiatrie*, 16 Suppl 1, pp.S1–8.
- Baud, O., Daire, J.-L., et al., 2004a. Gestational hypoxia induces white matter damage in neonatal rats: a new model of periventricular leukomalacia. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 14(1), pp.1–10.
- Baud, O., Haynes, R.F., et al., 2004b. Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. *The European journal of neuroscience*, 20(1), pp.29–40.
- Beck, K.F., 2005. Nitric Oxide Upregulates Induction of PDGF Receptor-Expression in Rat Renal Mesangial Cells and in Anti-Thy-1 Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(7), pp.1948–1957.
- Bellon, A. et al., 2010. VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron*, 66(2), pp.205–219.
- Ben Abdennebi, H. et al., 2011. How to protect liver graft with nitric oxide.

World journal of gastroenterology : WJG, 17(24), pp.2879–2889.

Bender, A.T. & Beavo, J.A., 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews*, 58(3), pp.488–520.

Benjamin, N. et al., 1994. Stomach NO synthesis. *Nature*, 368(6471), p.502.

Bennett, A.J. et al., 2001. Neurodevelopmental outcome in high-risk preterm infants treated with inhaled nitric oxide. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 90(5), pp.573–576.

Bohlen und Halbach, von, O., 2003. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide*, (9), pp.217–228.

Bon, C.L.M. & Garthwaite, J., 2003. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 23(5), pp.1941–1948.

Borderie, D. & Ekindjian, O.G., 2008. Assessment of the nitrosylation process. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 11(5), pp.587–591.

Bornstein, P., 2009. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3-4), pp.189–200.

Bourbon, J. et al., 2005. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric research*, 57(5 Pt 2), pp.38R–46R.

Brenman, J.E. et al., 1996. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, 84(5), pp.757–767.

Burd, I., Balakrishnan, B. & Kannan, S., 2012. Models of Fetal Brain Injury, Intrauterine Inflammation, and Preterm Birth. *American Journal of Reproductive Immunology*, 67(4), pp.287–294.

Buser, J.R., et al., 2012. Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. *Annals of Neurology*, 71(1), pp.93–109.

Bystron, I., Blakemore, C. & Rakic, P., 2008. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(2), pp.110–122.

-C-

Campbell, N.E. et al., 2010. The thrombospondin-1 mimetic ABT-510 increases the uptake and effectiveness of cisplatin and paclitaxel in a mouse model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 12(3), pp.275–283.

Carlezon Jr, W., Duman, R. & Nestler, E., 2005. The many faces of CREB. *Trends in neurosciences*, 28(8), pp.436–445.

Carmeliet, P., 2003. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and

- diseases. *Nature Reviews Genetics*, 4(9), pp.710–720.
- Charriaut-Marlangue, C. et al., 2012. Inhaled Nitric Oxide Reduces Brain Damage by Collateral Recruitment in a Neonatal Stroke Model. *Stroke*.
- Chen, M. et al., 2008. Differential Roles of NMDA Receptor Subtypes in Ischemic Neuronal Cell Death and Ischemic Tolerance. *Stroke*, 39(11), pp.3042–3048.
- Chen, Z.-Y. et al., 2010. Up-regulation of erythropoietin receptor by nitric oxide mediates hypoxia preconditioning. *Journal of Neuroscience Research*, 88(14), pp.3180–3188.
- Chen, Z.-Y., Warin, R. & Noguchi, C.T., 2006. Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response. *Neuro-degenerative diseases*, 3(1-2), pp.68–75.
- Cheung, P.Y. et al., 1998. Inhaled nitric oxide and inhibition of platelet aggregation in critically ill neonates. *The Lancet*, 351(9110), pp.1181–1182.
- Clementi, E. et al., 1998. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(13), pp.7631–7636.
- Cole, F.S. et al., 2011. NIH Consensus Development Conference statement: inhaled nitric-oxide therapy for premature infants. In *Pediatrics*. pp. 363–369.
- Collarini, E.J. et al., 1991. Growth factors and transcription factors in oligodendrocyte development. *Journal of cell science. Supplement*, 15, pp.117–123.
- Conahey, G.R. et al., 2008. Effect of inhaled nitric oxide on cerebrospinal fluid and blood nitrite concentrations in newborn lambs. *Pediatric research*, 64(4), pp.375–380.
- Contestabile, A., 2008. Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells. *Progress in Neurobiology*, 84(4), pp.317–328.
- Copp, A.J., Greene, N.D.E. & Murdoch, J.N., 2003. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nature Reviews Genetics*, 4(10), pp.784–793.
- Cosby, K. et al., 2003. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Medicine*, 9(12), pp.1498–1505.
- Craven, P.A. & DeRubertis, F.R., 1978. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *The Journal of biological chemistry*, 253(23), pp.8433–8443.

-D-

- D'Angio, C.T. & Maniscalco, W.M., 2002. The role of vascular growth factors in hyperoxia-induced injury to the developing lung. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, pp.d1609–23.
- de Vries, L.S. et al., 2011. Myth: Cerebral palsy cannot be predicted by neonatal brain imaging. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 16(5), pp.279–287.
- Dean, J.M. et al., 2011. Strain-Specific Differences in Perinatal Rodent Oligodendrocyte Lineage Progression and Its Correlation with Human. *Developmental neuroscience*, 33(3-4), pp.251–260.
- Degos, V. et al., 2008. Neuroprotective strategies for the neonatal brain. *Anesthesia and analgesia*, 106(6), pp.1670–1680.
- Deng, W., Pleasure, J. & Pleasure, D., 2008. Progress in periventricular leukomalacia. *Archives of neurology*, 65(10), pp.1291–1295.
- Dezfulian, C. et al., 2009. Nitrite therapy after cardiac arrest reduces reactive oxygen species generation, improves cardiac and neurological function, and enhances survival via reversible inhibition of mitochondrial complex I. *Circulation*, 120(10), pp.897–905.
- Dulak, J. & Józkowicz, A., 2002. Nitric oxide and angiogenic activity of endothelial cells: direct or VEGF-dependent effect? *Cardiovascular Research*, 56(3), pp.487–8; author reply 489–91.

-E-

- Ehrenreich, H. et al., 2002. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 8(8), pp.495–505.
- Ekambaram, P., 2011. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *The Indian journal of medical research*.

-F-

- Farinelli, M. et al., 2012. Selective Regulation of NR2B by Protein Phosphatase-1 for the Control of the NMDA Receptor in Neuroprotection J. Götz, ed. *PloS one*, 7(3), p.e34047.
- Ferreira, E.D. et al., 2012. Sildenafil provides sustained neuroprotection in the absence of learning recovery following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. *Brain Research Bulletin*, S0361-9230(12)00191-8.
- Folkerth, R.D. et al., 2004. Developmental lag in superoxide dismutases relative to other antioxidant enzymes in premyelinated human telencephalic white matter. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 63(9), pp.990–999.

Fontaine, R.H. et al., 2008. Vulnerability of white matter towards antenatal hypoxia is linked to a species-dependent regulation of glutamate receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), pp.16779-16784

Fricker-Gates, R.A., 2006. Radial glia: a changing role in the central nervous system. *Neuroreport*, 17(11), pp.1081-1084.

Furchgott, R.F., 1988. [CITATION][C]. *Mechanisms of Vasodilatation PM Vanhoutte*.

Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), pp.373-376.

-G-

Garthwaite, J., 2008. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience*, 27(11), pp.2783-2802.

Gavrikova, E.V. & Vinogradov, A.D., 1999. Active/de-active state transition of the mitochondrial complex I as revealed by specific sulfhydryl group labeling. *FEBS letters*, 455(1-2), pp.36-40.

Gerhardt, H. et al., 2004. Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 231(3), pp.503-509.

Ghafourifar, P. & Richter, C., 1997. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS letters*, 418(3), pp.291-296.

Ghazi, El, F. et al., 2012. NO-dependent protective effect of VEGF against excitotoxicity on layer VI of the developing cerebral cortex. *Neurobiology of Disease*, 45(3), pp.871-886.

Gladwin, M.T., 2008. Evidence Mounts That Nitrite Contributes to Hypoxic Vasodilation in the Human Circulation. *Circulation*, 117(5), pp.594-597.

Gladwin, M.T. et al., 2006. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 291(5), pp.H2026-H2035.

Gladwin, M.T. et al., 2000. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), pp.11482-11487.

Gladwin, M.T. et al., 2005. The emerging biology of the nitrite anion. In *Nature chemical biology*. pp. 308-314.

Govers, R. & Rabelink, T.J., 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Renal physiology*, 280(2), pp.F193-206.

- Gow, A.J. et al., 2004. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 287(2), pp.L262–8.
- Götz, M., Stoykova, A. & Gruss, P., 1998. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron*, 21(5), pp.1031–1044.
- Griffith, T.M. et al., 1984. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*, 308(5960), pp.645–647.
- Griffiths, M.J.D. & Evans, T.W., 2005. Inhaled nitric oxide therapy in adults. *New England Journal of Medicine*, 353(25), pp.2683–2695.
- Gross, S.S., 2001. Vascular biology. Targeted delivery of nitric oxide. *Nature*, 409(6820), pp.577–578.
- Gryglewski, R.J., Moncada, S. & Palmer, R.M., 1986a. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 87(4), pp.685–694.
- Gryglewski, R.J., Palmer, R.M. & Moncada, S., 1986b. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 320(6061), pp.454–456.

-H-

- Hagberg, H. & Mallard, C., 2005. Effect of inflammation on central nervous system development and vulnerability. *Current opinion in neurology*, 18(2), pp.117–123.
- Han, R. & Stewart, D., 2006. Defective Lung Vascular Development in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 16(1), pp.29–34.
- Hasina, R. et al., 2009. ABT-510 is an effective chemopreventive agent in the mouse 4-nitroquinoline 1-oxide model of oral carcinogenesis. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 2(4), pp.385–393.
- Hayakawa, K. et al., 2012. Cerebral endothelial derived vascular endothelial growth factor promotes the migration but not the proliferation of oligodendrocyte precursor cells in vitro. *Neuroscience letters*, 513(1), pp.42–46.
- Hayakawa, K. et al., 2011. Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells. *Journal of Neuroscience*, 31(29), pp.10666–10670.
- Haynes, R.L.R. et al., 2008. Diffuse axonal injury in periventricular leukomalacia as determined by apoptotic marker fractin. *Pediatric research*, 63(6), pp.656–661.
- Hemish, J., 2003. Nitric Oxide Activates Diverse Signaling Pathways to Regulate Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), pp.42321–42329.

- Hess, D.T. et al., 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(2), pp.150–166.
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R. & Vavrin, Z., 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4787), pp.473–476.
- Ho, J.J.D., Man, H.S.J. & Marsden, P.A., 2012. Nitric oxide signaling in hypoxia. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 90(3), pp.217–231.
- Hoch, R.V., Rubenstein, J.L.R. & Pleasure, S., 2009. Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(4), pp.378–386.
- Howell, A.S. & Shen, K., 2011. Semaphorin Breaks Symmetry. *Neuron*, 71(3), pp.381–382.
- Howlett, C.E. et al., 1999. Inhaled nitric oxide protects against hyperoxia-induced apoptosis in rat lungs. *The American journal of physiology*, 277(3 Pt 1), pp.L596–605.
- Högman, M. et al., 1993. Bleeding time prolongation and NO inhalation. *The Lancet*, 341(8861), pp.1664–1665.
- Huang, Z., 2005. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), pp.2099–2107.
- Huppi, P.S., 2002. Advances in postnatal neuroimaging: relevance to pathogenesis and treatment of brain injury. *Clinics in Perinatology*, 29(4), pp.827–856.

-I-

- Iadecola, C., 1997. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends in neurosciences*, 20(3), pp.132–139.
- Ignarro, L.J. et al., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), pp.9265–9269.
- Ignarro, L.J. et al., 1981. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 218(3), pp.739–749.
- Inder, T.E. et al., 2005. Abnormal cerebral structure is present at term in premature infants. *PEDIATRICS*, 115(2), pp.286–294.
- Inder, T.E. et al., 1999. Periventricular white matter injury in the premature infant is followed by reduced cerebral cortical gray matter volume at term. *Annals of neurology*, 46(5), pp.755–760.
- Isbell, T.S. et al., 2008. SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-

dependent hypoxic vasodilation. *Nature Medicine*, 14(7), pp.773–777.

Isenberg, J.S. et al., 2005. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), pp.13141–13146.

Isenberg, J.S. et al., 2007. Thrombospondin-1 inhibits nitric oxide signaling via CD36 by inhibiting myristic acid uptake. *The Journal of biological chemistry*, 282(21), pp.15404–15415.

Isenberg, J.S., Frazier, W.A. & Roberts, D.D., 2008a. Thrombospondins: from structure to therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5), pp.728–742.

Isenberg, J.S., Martin-Manso, G., et al., 2009a. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), pp.182–194.

Isenberg, J.S., Shiva, S. & Gladwin, M., 2009b. Thrombospondin-1–CD47 blockade and exogenous nitrite enhance ischemic tissue survival, blood flow and angiogenesis via coupled NO–cGMP pathway activation. *Nitric Oxide*, 21(1), pp.52–62.

Isenberg, J.S., Yu, C. & Roberts, D.D., 2008b. Differential effects of ABT-510 and a CD36-binding peptide derived from the type 1 repeats of thrombospondin-1 on fatty acid uptake, nitric oxide signaling, and caspase activation in vascular cells. *Biochemical pharmacology*, 75(4), pp.875–882.

Iyengar, R., Stuehr, D.J. & Marletta, M.A., 1987. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(18), pp.6369–6373.

-J-

Jaffrey, S.R. et al., 2001. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature cell biology*, 3(2), pp.193–197.

Jakkula, M. et al., 2000. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 279(3), pp.L600–7.

Jakobsson, L., Bentley, K. & Gerhardt, H., 2009. VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 6), pp.1233–1236.

Jeffers, A. et al., 2005. Hemoglobin mediated nitrite activation of soluble guanylyl cyclase. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 142(2), pp.130–135.

Jobe, A.H., 2011. The new bronchopulmonary dysplasia. *Current opinion in pediatrics*, 23(2), pp.167–172.

-K-

- Kaindl, A.M. et al., 2012. Activation of microglial NMDA receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Annals of neurology*, pp.n/a–n/a.
- Katsuki, S., Arnold, W.P. & Murad, F., 1977. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *Journal of cyclic nucleotide research*, 3(4), pp.239–247.
- Kearney, J.B. et al., 2004. The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood*, 103(12), pp.4527–4535.
- Kinsella, J.P. & Abman, S.H., 1996. Clinical pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn and the role of inhaled nitric oxide therapy. *Journal of Perinatology*, 16(2 Pt 2 Su), pp.S24–7.
- Kinsella, J.P. et al., 1992. Low-dose inhalation nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *The Lancet*, 340(8823), pp.819–820.
- Kinsella, J.P., Cutter, G.R., et al., 2006a. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure. *New England Journal of Medicine*, 355(4), pp.354–364.
- Kinsella, J.P., GREENOUGH, A. & Abman, S.H., 2006b. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*, 367(9520), pp.1421–1431.
- Kitagawa, K., 2007. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS Journal*, 274(13), pp.3210–3217.
- Koch, S. et al., 2011. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal*, 437(2), pp.169–183.
- Koentges, G., 2008. Evolution of anatomy and gene control. *Nature*, 451(7179), pp.658–663.
- Komuro, H. & Rakic, P., 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5104), pp.95–97.
- Kriegstein, A.R. & Noctor, S.C., 2004. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in neurosciences*, 27(7), pp.392–399.
- Kunz, A. et al., 2007. Neurovascular Protection by Ischemic Tolerance: Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Journal of Neuroscience*, 27(27), pp.7083–7093.

-L-

- Lagercrantz, H. et al., 2010. *The Newborn Brain: Neuroscience and Clinical Applications* 2nd ed. H. Lagercrantz, ed., Cambridge University Press.

- Lancaster, J.R., 1994. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(17), pp.8137–8141.
- Larroque, B. et al., 2008. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *The Lancet*, 371(9615), pp.813–820.
- Lau, G.C. et al., 2004. Up-regulation of NMDAR1 subunit gene expression in cortical neurons via a PKA-dependent pathway. *Journal of neurochemistry*, 88(3), pp.564–575.
- Le Cras, T.D. et al., 2002. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 283(3), pp.L555–62.
- Lee, H.S. et al., 2009. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: regulation, molecular and cellular communication at the neurovascular interface. *FEBS Journal*, 276(17), pp.4622–4635.
- Levison, S.W. et al., 2001. Hypoxia/ischemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells. *Developmental neuroscience*, 23(3), pp.234–247.
- Leviton, A. & GILLES, F., 1996. Ventriculomegaly, delayed myelination, white matter hypoplasia, and “periventricular” leukomalacia: how are they related? *Pediatric Neurology*, 15(2), pp.127–136.
- Leviton, A. et al., 1999. Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. Developmental Epidemiology Network Investigators. *Pediatric research*, 46(5), pp.566–575.
- Ligam, P. et al., 2009. Thalamic damage in periventricular leukomalacia: novel pathologic observations relevant to cognitive deficits in survivors of prematurity. *Pediatric research*, 65(5), pp.524–529.
- Lin, Y. et al., 2001. Quantitative evaluation of thalami and basal ganglia in infants with periventricular leukomalacia. *Developmental medicine and child neurology*, 43(7), pp.481–485.
- Liu, L. & Stamler, J.S., 1999. NO: an inhibitor of cell death. *Cell death and differentiation*, 6(10), pp.937–942.
- Liu, Y. et al., 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience*, 27(11), pp.2846–2857.
- Lonze, B.E. & Ginty, D.D., 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), pp.605–623.
- Lonze, B.E. et al., 2002. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*, 34(3), pp.371–385.

- Loron, G. et al., 2010. Ciprofloxacin prevents myelination delay in neonatal rats subjected to E. coli sepsis. *Annals of neurology*.
- Lu, Y.-F. & Hawkins, R.D., 2002. Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 88(3), pp.1270–1278.
- Luján, R., Shigemoto, R. & López-Bendito, G., 2005. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, 130(3), pp.567–580.
- Lunardi, C.N. et al., 2007. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)(2)(NO)](PF(6)) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. *Vascular Pharmacology*, 47(2-3), pp.139–144.
- Lundberg, J.O. et al., 1994. Intra gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut*, 35(11), pp.1543–1546.

-M-

- Mackenzie, F. & Ruhrberg, C., 2012. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development*, 139(8), pp.1371–1380.
- Maher, A.R. et al., 2008. Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans. *Circulation*, 117(5), pp.670–677.
- Malek, M.H. & Olfert, I.M., 2009. Global deletion of thrombospondin-1 increases cardiac and skeletal muscle capillarity and exercise capacity in mice. *Experimental physiology*, 94(6), pp.749–760.
- Mallard, E.C. et al., 1998. Effects of chronic placental insufficiency on brain development in fetal sheep. *Pediatric research*, 43(2), pp.262–270.
- Manning, S.M. et al., 2008. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. *Journal of Neuroscience*, 28(26), pp.6670–6678.
- Marret, S. et al., 1995. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 54(3), pp.358–370.
- Marsh, N. & Marsh, A., 2000. *A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology*,
- Martin, R.J., Fanaroff, A.A. & Walsh, M.C., 2010. *Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine Diseases of the Fetus and Infant*,
- McCurnin, D.C. et al., 2005. Inhaled NO improves early pulmonary function and modifies lung growth and elastin deposition in a baboon model of neonatal chronic lung disease. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 288(3), pp.L450–9.
- McMahon, T.J. et al., 2000. Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S-nitrosohemoglobin. *The Journal of biological chemistry*,

275(22), pp.16738–16745.

McQuade, L.E. & Lippard, S.J., 2010. Fluorescent probes to investigate nitric oxide and other reactive nitrogen species in biology (truncated form: fluorescent probes of reactive nitrogen species). *Current opinion in chemical biology*, 14(1), pp.43–49.

McQuillen, P.S. et al., 2003. Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Neuroscience*, 23(8), pp.3308–3315.

Mercier, J.-C. et al., 2009. Inhaled nitric oxide to prevent bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 14(1), pp.28–34.

Merkle, F.T. & Alvarez-Buylla, A., 2006. Neural stem cells in mammalian development. *Current opinion in cell biology*, 18(6), pp.704–709.

Mesplès, B. et al., 2005. Pathophysiology of neonatal brain lesions: lessons from animal models of excitotoxicity. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 94(2), pp.185–190.

Mestan, K.K.L. et al., 2005. Neurodevelopmental outcomes of premature infants treated with inhaled nitric oxide. *New England Journal of Medicine*, 353(1), pp.23–32.

Miller, F.D. & Gauthier, A.S., 2007. Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron*, 54(3), pp.357–369.

Miller, S.S. & Rhine, W.D., 2008. Inhaled nitric oxide in the treatment of preterm infants. *Early Human Development*, 84(11), pp.703–707.

Mittal, C.K., Arnold, W.P. & Murad, F., 1978. Characterization of protein inhibitors of guanylate cyclase activation from rat heart and bovine lung. *The Journal of biological chemistry*, 253(4), pp.1266–1271.

Molnár, Z. et al., 2010. *New Aspects of Axonal Structure and Function* D. Feldmeyer & J. H. R. Lübke, eds., Boston, MA: Springer US.

Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A., 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical pharmacology*, 38(11), pp.1709–1715.

Murphy-Ullrich, J.E. & Iozzo, R.V., 2012. Thrombospondins in physiology and disease: New tricks for old dogs. *Matrix Biology*, 31(3), pp.152–154.

-N-

Nabors, L.B. et al., 2010. A phase 1 trial of ABT-510 concurrent with standard chemoradiation for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Archives of neurology*, 67(3), pp.313–319.

Nagababu, E. et al., 2003. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *The*

Journal of biological chemistry, 278(47), pp.46349–46356.

Nagase, T. et al., 2005. Angiogenesis within the developing mouse neural tube is dependent on sonic hedgehog signaling: possible roles of motor neurons. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 10(6), pp.595–604.

Noguchi, C.T. et al., 2007. Role of erythropoietin in the brain. *Critical reviews in oncology/hematology*, 64(2), pp.159–171.

Nowacka, M.M. & Obuchowicz, E., 2012. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: A new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action. *Neuropeptides*, 46(1), pp.1–10.

Nyakas, C., Buwalda, B. & Luiten, P.G., 1996. Hypoxia and brain development. *Progress in Neurobiology*, 49(1), pp.1–51.

-O-

Ogunshola, O.O. et al., 2002. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *The Journal of biological chemistry*, 277(13), pp.11410–11415.

Olivier, P. et al., 2010. Nitric oxide plays a key role in myelination in the developing brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(8), pp.828–837.

Ozdegirmenci, O. et al., 2011. Effects of sildenafil and tadalafil on ischemia/reperfusion injury in fetal rat brain. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 24(2), pp.317–323.

-P-

Palmer, R.M., Ferrige, A.G. & Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), pp.524–526.

Papapetropoulos, A. et al., 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 100(12), pp.3131–3139.

Paul, V. & Ekambaram, P., 2011. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *The Indian journal of medical research*, 133, pp.471–478.

Pawloski, J.R. & Stamler, J.S., 2002. Nitric oxide in RBCs. *Transfusion*, 42(12), pp.1603–1609.

Pepine, C.J., 2009. The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. *The American journal of medicine*, 122(5 Suppl), pp.S10–5.

Peterson, B.S. et al., 2000. Regional brain volume abnormalities and long-term

cognitive outcome in preterm infants. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 284(15), pp.1939–1947.

Peterson, B.S. et al., 2003. Regional brain volumes and their later neurodevelopmental correlates in term and preterm infants. *PEDIATRICS*, 111(5 Pt 1), pp.939–948.

Pham, H. et al., 2012. Inhaled NO protects cerebral white matter in neonatal rats with combined brain and lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 185(8), pp.897–899.

Pierson, C.R. et al., 2007. Gray matter injury associated with periventricular leukomalacia in the premature infant. *Acta Neuropathologica*, 114(6), pp.619–631.

Polin, R.A., Fox, W.W. & Abman, S.H., 2011. *Fetal and Neonatal Physiology*, W.B. Saunders Company.

Posenchev, M.A. et al., 2009. Inhaled nitric oxide in premature infants: effect on tracheal aspirate and plasma nitric oxide metabolites. *Journal of Perinatology*, 30(4), pp.275–280.

-R-

Raab, S. et al., 2004. Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thrombosis and Haemostasis*, 91(3), pp.595–605.

Radi, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), pp.4003–4008.

Rakic, P. & Lombroso, P.J., 1998. Development of the cerebral cortex: I. Forming the cortical structure. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 37(1), pp.116–117.

Rani, C.S.S., 2005. Potential Role of cAMP Response Element-Binding Protein in Ethanol-Induced N-Methyl-D-aspartate Receptor 2B Subunit Gene Transcription in Fetal Mouse Cortical Cells. *Molecular Pharmacology*, 67(6), pp.2126–2136.

Rees, S.M. et al., 2007. Inhaled nitric oxide: effects on cerebral growth and injury in a baboon model of premature delivery. *Pediatric research*, 61(5 Pt 1), pp.552–558.

Riccio, A. et al., 2006. A Nitric Oxide Signaling Pathway Controls CREB-Mediated Gene Expression in Neurons. *Molecular Cell*, 21(2), pp.283–294.

Rice, J.E., Vannucci, R.C. & Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of neurology*, 9(2), pp.131–141.

- Ridnour, L.A. et al., 2005. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), pp.13147–13152.
- Rifkind, J. et al., 2007. Nitrite infusion increases cerebral blood flow and decreases mean arterial blood pressure in rats: A role for red cell NO. *Nitric Oxide*, 16(4), pp.448–456.
- Risher, W.C. & Eroglu, C., 2012. Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biology*, 31(3), pp.170–177.
- Roberts, D.D. et al., 2007. Nitric Oxide and Its Gatekeeper Thrombospondin-1 in Tumor Angiogenesis. *Clinical Cancer Research*, 13(3), pp.795–798.
- Roberts, D.D. et al., 2012. The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47. *Matrix Biology*, 31(3), pp.162–169.
- Roberts, J.D. et al., 1992. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *The Lancet*, 340(8823), pp.818–819.
- Robinson, S. et al., 2006. Neonatal loss of gamma-aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury. *Journal of neurosurgery*, 104(6 Suppl), pp.396–408.
- Rosenstein, J.M. et al., 2003. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(35), pp.11036–11044.
- Rudic, R.D. et al., 1998. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, 101(4), pp.731–736.
- Ruiz de Almodovar, C. et al., 2010. Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *Journal of Neuroscience*, 30(45), pp.15052–15066.

-S-

- Sarti, P. et al., 2011. *Advances in Experimental Medicine and Biology* R. Scatena, P. Bottoni, & B. Giardina, eds., Dordrecht: Springer Netherlands.
- Schreiber, M.D. et al., 2003. Inhaled nitric oxide in premature infants with the respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 349(22), pp.2099–2107.
- Schwarz, Q. et al., 2004. Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes & development*, 18(22), pp.2822–2834.

- Shelly, M. et al., 2011. Semaphorin3A Regulates Neuronal Polarization by Suppressing Axon Formation and Promoting Dendrite Growth. *Neuron*, 71(3), pp.433–446.
- Sie, L.T. et al., 2000. Early MR features of hypoxic-ischemic brain injury in neonates with periventricular densities on sonograms. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 21(5), pp.852–861.
- Silverman, W.F. et al., 1999. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience*, 90(4), pp.1529–1541.
- Skimming, J.W. et al., 1997. Nitric oxide inhalation in infants with respiratory distress syndrome. *YMPD*, 130(2), pp.225–230.
- Sondell, M., Lundborg, G. & Kanje, M., 1999. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *Journal of Neuroscience*, 19(14), pp.5731–5740.
- Stamler, J.S., 1994. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78(6), pp.931–936.
- Stamler, J.S. et al., 1997. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), pp.2034–2037.
- Stamler, J.S., Jaraki, O., et al., 1992a. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), pp.7674–7677.
- Stamler, J.S., Lamas, S. & Fang, F.C., 2001. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, 106(6), pp.675–683.
- Stamler, J.S., Reynolds, J.D. & Hess, D.T., 2012. Endocrine Nitric Oxide Bioactivity and Hypoxic Vasodilation by Inhaled Nitric Oxide. *Circulation Research*, 110(5), pp.652–654.
- Stamler, J.S., Singel, D.J. & Loscalzo, J., 1992b. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), pp.1898–1902.
- Steinert, J.R., Chernova, T. & Forsythe, I.D., 2010. Nitric Oxide Signaling in Brain Function, Dysfunction, and Dementia. *The Neuroscientist*, 16(4), pp.435–452.

-T-

- Tahraoui, S.L. et al., 2001. Central role of microglia in neonatal excitotoxic lesions of the murine periventricular white matter. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 11(1), pp.56–71.
- Talos, D.M. et al., 2006. Developmental regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-

methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. I. Rodent cerebral white matter and cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 497(1), pp.42–60.

Tam, S.J. & Watts, R.J., 2010. Connecting Vascular and Nervous System Development: Angiogenesis and the Blood-Brain Barrier. *Annual Review of Neuroscience*, 33(1), pp.379–408.

Tang, J.-R. et al., 2007. Early inhaled nitric oxide treatment decreases apoptosis of endothelial cells in neonatal rat lungs after vascular endothelial growth factor inhibition. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 293(5), pp.L1271–80.

Tang, J.R., 2004. Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(2), pp.L344–L351.

Tegenge, M.A. et al., 2010. Nitric oxide stimulates human neural progenitor cell migration via cGMP-mediated signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), pp.2089–2099.

Terpolilli, N.A., Kim, S.W., et al., 2012a. Inhalation of Nitric Oxide Prevents Ischemic Brain Damage in Experimental Stroke by Selective Dilatation of Collateral Arterioles. *Circulation Research*, 110(5), pp.727–738.

Terpolilli, N.A., Moskowitz, M.A. & Plesnila, N., 2012b. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. 32(7), pp.1332–1346.

Thébaud, B. & Abman, S.H., 2007. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(10), pp.978–985.

Thippeswamy, T. et al., 2006. Nitric oxide, a biological double-faced janus--is this good or bad? *Histology and histopathology*, 21(4), pp.445–458.

Thomas, D.D. et al., 2001. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), pp.355–360.

Toda, N. & Herman, A.G., 2005. Gastrointestinal function regulation by nitrergic efferent nerves. *Pharmacological reviews*, 57(3), pp.315–338.

Tsai, E.J. & Kass, D.A., 2009. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 122(3), pp.216–238.

-V-

Van Meurs, K.P. et al., 2005. Inhaled nitric oxide for premature infants with severe respiratory failure. *New England Journal of Medicine*, 353(1), pp.13–22.

- Van Vactor, D.V. & Lorenz, L.J., 1999. Neural development: The semantics of axon guidance. *Current biology : CB*, 9(6), pp.R201–4.
- Velde, C.V. & Cleveland, D.W., 2005. VEGF: multitasking in ALS. *Nature neuroscience*.
- Virchow, R., 1867. Congenitale Encephalitis und Myelitis. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, 38(1), pp.129–138.
- Volpe, J.J., 2005. Encephalopathy of prematurity includes neuronal abnormalities. *PEDIATRICS*, 116(1), pp.221–225.
- Volpe, J.J., 2001. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatric research*, 50(5), pp.553–562.
- Volpe, J.J., 1996. Subplate neurons--missing link in brain injury of the premature infant? *PEDIATRICS*, 97(1), pp.112–113.
- Volpe, J.J. et al., 2011. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(4), pp.423–440.

-W-

- Wang, S. et al., 2003. Thrombospondin-1-deficient mice exhibit increased vascular density during retinal vascular development and are less sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 228(4), pp.630–642.
- Wegner, M. & Stolt, C.C., 2005. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends in neurosciences*, 28(11), pp.583–588.
- Williams, A. et al., 2007. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain*, 130(10), pp.2554–2565.
- Wittko, I.M. et al., 2009. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *Journal of Neuroscience*, 29(27), pp.8704–8714.
- Woodward, L.J. et al., 2006. Neonatal MRI to predict neurodevelopmental outcomes in preterm infants. *New England Journal of Medicine*, 355(7), pp.685–694.

-X-Y-Z-

- Xenocostas, A. et al., 2005. The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *European journal of clinical pharmacology*, 61(3), pp.189–195.
- Yoon, B.H. et al., 2000. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *American*

journal of obstetrics and gynecology, 182(3), pp.675–681.

Zerlin, M., Julius, M.A. & Kitajewski, J., 2008. Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis. *Angiogenesis*, 11(1), pp.63–69.

Zhang, L. et al., 2010. Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat. *PloS one*, 5(6), p.e11016.

Zhang, R., 2003. Nitric Oxide Enhances Angiogenesis via the Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor and cGMP After Stroke in the Rat. *Circulation Research*, 92(3), pp.308–313.

Zhang, R., 2002. Sildenafil (Viagra) Induces Neurogenesis and Promotes Functional Recovery After Stroke in Rats. *Stroke*, 33(11), pp.2675–2680.

Zhu, J. et al., 2002. beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development*, 129(12), pp.2891–2903.

Ziche, M. et al., 1997. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 99(11), pp.2625–2634.

Zweier, J.L. et al., 1995. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature Medicine*, 1(8), pp.804–809.